

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Universität
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Die *Trailer*-Sequenz der viralen RNA ist Teil des RIG-I-Liganden bei Infektion mit
Vesicular-Stomatitis-Virus

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von Nicolas Linder
aus München
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Anne Krug
Prof. Dr. med. Josef Eberle

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Andreas Schmidt
Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2016

für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---------------|
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1 Das Immunsystem des Menschen..... | 6 |
| 1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität..... | 6 |
| 1.1.2 Mustererkennungsrezeptoren | 7 |
| 1.1.3 RIG-I-like-Helikasen..... | 9 |
| 1.2 Beschriebene synthetische RIG-I-Liganden im Vergleich..... | 13 |
| 1.3 Das Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV)..... | 16 |
| 1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit | 18 |
| 2. Material und Methoden | 20 |
| 2.1 Material..... | 20 |
| 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 2.1.2 Computerprogramme..... | 21 |
| 2.1.3 Reagenziensätze..... | 21 |
| 2.1.4 Reagenzien | 21 |
| 2.1.5 Zellkulturmedien | 22 |
| 2.1.6 Puffer..... | 22 |
| 2.1.7 Antikörper..... | 23 |
| 2.1.8 Plasmide..... | 23 |
| 2.1.9 Oligonukleotide | 24 |
| 2.1.10 RT-PCR Primer..... | 24 |
| 2.2 Zellkultur..... | 25 |
| 2.2.1 HEK-293-Zellen..... | 25 |
| 2.2.2 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen..... | 25 |
| 2.2.3 BHK-Zellen | 26 |
| 2.2.4 Flp-In-T-Rex-Zellen mit Tetrazyklin-abhängiger RIG-I-Expression..... | 26 |

| | |
|---|--------|
| 2.3 Virologische Methoden | 29 |
| 2.3.1 Kultivierung des Vesicular-Stomatitis-Virus | 29 |
| 2.3.2 Plaque-assay für VSV | 29 |
| 2.3.3 Infektion von HEK-293-Zellen mit VSV | 31 |
| 2.4 Proteinbiochemische Methoden | 31 |
| 2.4.1 Herstellung von Zelllysaten | 31 |
| 2.4.2 Western Blot | 32 |
| 2.4.3 Koimmunpräzipitation | 32 |
| 2.5 Molekularbiologische Methoden | 36 |
| 2.5.1 Bakterien-Transformation | 36 |
| 2.5.2 Plasmid-Präparation | 37 |
| 2.5.3 Polymerase-chain-Reaktion (PCR) | 38 |
| 2.5.4 In-vitro-Transkription | 39 |
| 2.5.5 RNA-Isolation mit Phenol-Chloroform | 39 |
| 2.5.6 Reverse Transkription | 41 |
| 2.5.7 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) | 42 |
| 2.5.8 Deep sequencing | 44 |
| 3. Ergebnisse | 45 |
| 3.1 Etablierung eines Protokolls zur Isolation RIG-I-gebundener viraler RNA | 45 |
| 3.1.1 Die VSV-Infektion transient RIG-I/FLAG-exprimierender HEK-Zellen eignet sich nicht zur Isolation von RNA-Liganden | 45 |
| 3.1.2 Die vollständige Lyse der Zellen und RNase-freie Bedingungen sind entscheidend für die Aufreinigung von RIG-I-Liganden | 46 |
| 3.1.3 Mit der Phenol-Chloroform-Methode kann RNA aus RIG-I/FLAG-Komplexen isoliert werden | 47 |
| 3.2 Die maximale Menge VSV-RNA ist nach neun Stunden Infektion nachzuweisen .. | 48 |
| 3.2.1 RIG-I/FLAG lässt sich aus Lysat VSV-infizierter Zellen immunpräzipitieren .. | 49 |
| 3.2.2 Im RIG-I/FLAG-Koimmunpräzipitat ist VSV-RNA nachweisbar | 50 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3 | <i>Deep sequencing</i> RIG-I-gebundener RNA | 51 |
| 3.3.1 | RNA-Analyse, cDNA-Synthese und Gel-Fraktionierung bereiten das deep sequencing vor | 52 |
| 3.3.2 | RIG-I-assoziierte RNA kann mittels deep sequencing analysiert werden..... | 56 |
| 3.3.3 | In Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen ist die Trailer-RNA nachweisbar | 60 |
| 3.3.4 | Die Trailer-Sequenz der viralen RNA ist Teil des RIG-I-Liganden bei Infektion mit VSV..... | 61 |
| 3.3.5 | In der RIG-I/FLAG-koimmunpräzipitierten RNA findet sich der größte Anteil viraler gegenüber humaner RNA..... | 66 |
| 4. | Diskussion | 68 |
| 4.1 | Übersicht der Ergebnisse | 68 |
| 4.2 | Diskussion der angewandten Methodik..... | 69 |
| 4.2.1 | Koimmunpräzipitation..... | 69 |
| 4.2.2 | Deep sequencing..... | 70 |
| 4.3 | Beschriebene virale RIG-I-Liganden..... | 73 |
| 4.4 | Die VSV-trailer-RNA als Teil des RIG-I-Liganden | 78 |
| 5. | Ausblick | 82 |
| 6. | Zusammenfassung | 84 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 85 |
| 8. | Abkürzungen und Akronyme | 91 |
| 9. | Danksagung | 94 |

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem des Menschen

1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem des Menschen gliedert sich in einen angeborenen und einen erworbenen, adaptiven Anteil, wobei die klassischen Grenzen zwischen diesen Systemen zusehends verwischen.

Die angeborene Immunität beginnt an der Schwelle zwischen Umwelt und Körper. Makroskopisch stellen beim Menschen die Haut oder Schleimhautsekrete, wie der saure Magensaft, physikalische Barrieren gegen Mikroorganismen und Viren dar. Auf molekularer Ebene erkennt die angeborene Immunität im Falle einer Infektion die eindringenden mikrobiellen Erreger (englisch *pathogens*). Dabei interagieren sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern-recognition-Rezeptoren* = PRR) mit spezifischen Erreger-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular pattern* = PAMP) und leiten über Signalkaskaden genetische Abwehrprogramme ein. Virus-infizierte Zellen sezernieren in der Folge Zytokine, wie Interferone (IFN), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) oder den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Neutrophile Granulozyten und andere Immunzellen werden aus dem Blut zum Ort der Infektion rekrutiert. Die Leber produziert Akute-Phase-Proteine. Häufig ist so eine rasche Elimination des Virus innerhalb weniger Stunden möglich.

Durch PAMPs werden aber auch Antigen-präsentierende Zellen (APC) stimuliert. Diese stellen die zelluläre Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Gegen ein Antigen kann dann eine langlebige adaptive Immunität gebildet werden, wenn es von einer APC im Kontext mit einem PAMP als Gefahrensignal phagozytiert wurde (Blander *et al.* 2006).

Nach der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten durch APCs kommt es zu deren klonaler Expansion. Diese führt zur Produktion spezifischer Antikörper und zytotoxischer T-Zellen. Die langlebigen Formen von B- und T-Lymphozyten bilden das „Gedächtnis“ der Immunität. Bei erneuter Exposition mit demselben Erreger kann so effektiver reagiert werden.

Eine Schlüsselrolle bei der Entscheidung, ob eine molekulare Struktur als fremd und gefährlich erkannt und damit eine Immunantwort ausgelöst wird, kommt also den Mustererkennungsrezeptoren zu. Die vorliegende Arbeit untersucht den antiviralen Mustererkennungsrezeptor *retinoic acid-inducible gene-I* (RIG-I) und die Frage, welcher Ligand in einer Virus-infizierten Zelle von RIG-I erkannt wird.

1.1.2 Mustererkennungsrezeptoren

PAMPs sind invariante Strukturen, die von einer großen Klasse an pathogenen Keimen geteilt werden. Sie sind für die Erregerklasse spezifisch und essentiell für ihr Überleben. Physiologischerweise kommen PAMPs im Wirt entweder überhaupt nicht, oder nur in bestimmten Kompartimenten vor und erlauben damit eine Fremd-Selbst Unterscheidung. PAMPs werden durch PRR erkannt.

Auch Nukleinsäuren können als PAMPs dienen. Dies birgt jedoch das Risiko, dass die PRR auch endogene Nukleinsäuren als PAMPs erkennen und so Autoimmunität induzieren (Kawasaki *et al.* 2011). Daher ist die Erkennung von Nukleinsäuren als PAMPs besonders interessant. Die wichtigsten Vertreter der PRR, die Nukleinsäuren erkennen, werden wie folgt eingeteilt.

Die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) sind auf der Oberfläche der Zellmembran oder im endosomalen Kompartiment eukaryotischer Zellen lokalisiert. Mit Hilfe extrazellulärer, Leucin-reicher Sequenzen (*Leucin-rich repeats* = *LRR*) erkennen sie PAMPs von Bakterien und Viren. Bestimmte TLRs, wie TLR 3, 7, 8 und 9 erkennen mikrobielle Nukleinsäuren und lösen eine Typ-I-IFN-Antwort aus.

Die *Nod-like*-Rezeptoren mit ihrer charakteristischen C-terminalen LRR und der internen Nukleotid-bindenden-Domäne (NBD) erkennen zytoplasmatische PAMPs. Dies führt unter anderem zu einer erhöhten Expression von IL-1 β (Girardin *et al.* 2003).

Absent-in-melanoma 2 (AIM2) ist ein DNA-Rezeptor, der über *apoptosis-associated-speck-like-protein-containing a caspase-recruitment-domain* (ASC) zur Bildung eines Protein-Komplex, dem sogenannten Inflammasom, führt, welcher die Caspase-1-abhängige Aktivierung von IL-1 β und IL-18 auslöst (Hornung *et al.* 2009).

Die *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) stellt einen erst kürzlich entdeckten Rezeptor der angeborenen Immunität dar. Lange Zeit wurde nach diesem DNA-Rezeptor gesucht. Die Vorlagen-unabhängige Nucleotidyltransferase cGAS bildet, nach ihrer Aktivierung durch Bindung mikrobieller DNA im Zytoplasma, zyklische Dinukleotide als sekundäre Botenstoffe. Daraufhin wird über den Rezeptor STING ein antivirales Genprogramm aktiviert. (Sun *et al.* 2013, Wu *et al.* 2013)

Die wohl wichtigste Gruppe von PRR für die zytoplasmatische Erkennung von RNA-Viren sind die *RIG-I-like*-Helikasen (RLH), die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

1.1.3 RIG-I-like-Helikasen

Die Gruppe der RLH besteht aus RIG-I, *laboratories-of-genetics-and-physiology 2* (LGP2) und *melanoma-differentiation-associated gene 5* (MDA5). Diese PRR erkennen virale RNA im Zytoplasma und lösen nach Aktivierung ein antivirales Genprogramm aus, das die Produktion von Typ-I-IFN einschließt. Dadurch wird die Vermehrung und Ausbreitung der Viren erschwert und die adaptive Immunantwort eingeleitet.

Wie die virale von endogener RNA unterschieden werden kann, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen und zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Grundproblem der Erkennung viraler RNA im Zytoplasma von Zellen ist die dort vorliegende, große Menge endogener RNA unterschiedlicher Funktion und Struktur. Im Jahr 2006 wurde entschlüsselt, dass ein 5'-Triphosphat-Muster dem Immunsystem die Unterscheidung fremder von eigener RNA im Zytoplasma erlaubt (Hornung *et al.* 2006 und Pichlmaier *et al.* 2006). Neuere Daten zeigen, dass eine 5'-Diphosphat-Konfiguration für die Erkennung fremder RNA ausreicht (Goubau *et al.* 2014).

Zwar können auch zelleigene RNAs diese Modifikation tragen, doch die Generierung solcher RNAs findet im Zellkern oder im Mitochondrium statt. Eukaryotische *Messenger*-RNA (mRNA), welche ins Zytoplasma gelangt, erfährt durch ein modifiziertes Guanin-Nukleosid kotranskriptionell ein *capping* des 5'-Endes und wird daher nicht von RIG-I erkannt.

RIG-I ist der am besten charakterisierte Vertreter der RLH. RIG-I wurde ursprünglich in Zellen von Patienten identifiziert, die an promyeloischer Leukämie erkrankt waren und mit Vitamin-A-Säure behandelt wurden (Sun 1997). Nachfolgend wurde im Schwein ein Homolog von RIG-I identifiziert, dessen Expression sich durch Infektion mit dem Porzinen-Reproduktiven-und-Respiratorischen-Syndrom-Virus (PRRSV) induzieren ließ (Zhang *et al.* 2000).

Im Jahr 2004 wurde der erste Zusammenhang zwischen RIG-I und der Erkennung fremder Nukleinsäuren hergestellt (Yoneyama 2004): abhängig von der Transfektion mit *poly*(Inosin:Cytidin) [*poly*(I:C)], einer synthetischen Doppelstrang-RNA (dsRNA) mit 5'-Diphosphat-Ende, wurde gezeigt, dass RIG-I die Expression eines *Interferon response factor* (IRF)-regulierten Reportergens auslösen kann. Zudem wurde in dieser Arbeit RIG-I als *Copy*-DNA (cDNA)-Klon isoliert und eine erste Verbindung zwischen RIG-I und der Erkennung des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) beschrieben.

RIG-I gehört zu der Familie der DExD/H-Helikasen, die Teil der Helikasen-Superfamilie 2 (SF2) sind. Am Amino-Terminus (N-Terminus) trägt RIG-I zwei charakteristische *Caspase-activation-and-recruitment*-Domänen (CARDs) (siehe Abbildung 1). Im strukturellen Zentrum von RIG-I liegt die Helikase-Domäne. DExD/H bezeichnet die Reihenfolge der Aminosäuren in Motiv II (auch „*Walker motifs*“) der Helikase-Domäne: Asp-Glu-X-Asp/His. Die Position X steht für eine variable Aminosäure. Die C-terminale Domäne (CTD) spielt eine wichtige Rolle in der primären Liganden-Erkennung.

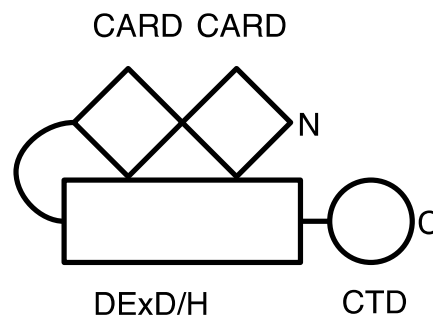


Abbildung 1: Die Struktur von RIG-I im Zustand der Autoinhibition

RIG-I ist aus zwei N-terminalen CARDs, einer Helikase-Domäne (DExD/H) und einer C-terminalen Domäne (CTD) aufgebaut. Wenn kein Ligand an RIG-I gebunden ist, falten die CARDs auf die Helikase-Domäne zurück und RIG-I liegt in einem autoinhibierten Zustand vor. (adaptiert nach Yoneyama und Fujita 2009)

RIG-I beinhaltet mit der Helikasen-Domäne und der CTD zwei RNA-bindende Domänen. Strukturanalysen der letzten Jahre (Cui *et al.* 2008, Takahashi *et al.* 2008, Kowalinski *et al.* 2011) konnten zeigen, dass zunächst die CTD-Domäne den Liganden Triphosphat-RNA bindet (siehe Abbildung 2). Nach dieser Bindung interagiert die RNA mit der Helikasen-Domäne.

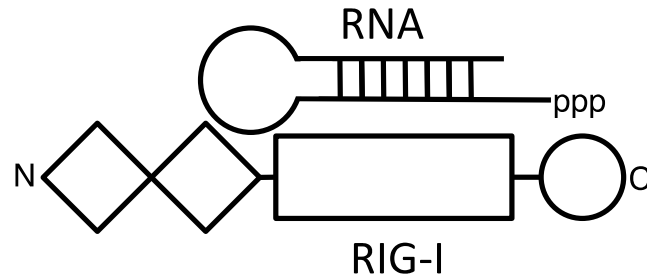


Abbildung 2: RIG-I bindet RNA

Nach Bindung der Triphosphat-RNA an die C-terminale Domäne, geben die beiden N-terminalen CARDs die Helikase-Domäne frei. (adaptiert nach Yoneyama und Fujita 2009)

In der Folge wird durch eine Konformationsänderung die Autoinhibition der Helikasen-Domäne durch die CARDs aufgehoben. Die CARDs aktivieren das *Mitochondrial-anti-viral-signalling*-Protein (MAVS), indem sie mit dessen CARDs interagieren. Es kommt über verschiedene Signalwege (siehe Abbildung 3) zur Translokation der Transkriptionsfaktoren *activator protein 1* (AP1), *nuclear-factor-κ-B* (NFκB), IRF3 und IRF7 in den Zellkern, wo diese kooperativ die Expression von Typ-I-IFN induzieren (Collins *et al.* 2004).

Ein Basenaustausch von Lysin zu Alanin in der Helikase-Domäne zeigte, dass die ATPase Funktion von RIG-I für die Viruserkennung und Signalauslösung erforderlich ist. Ohne das in der Hydrolyse des ATP essentielle Lysin entstand eine dominant-negative Form von RIG-I (Yoneyama *et al.* 2004).

Die Analyse von RIG-I-*knockout*-Mäusen zeigte, dass RIG-I sowohl in Fibroblasten, als auch in myeloiden dendritischen Zellen (DC) eine bedeutende Rolle in der viral induzierten Typ-I-IFN-Expression spielt (Kato *et al.* 2005).

Im Gegensatz dazu verwenden plasmazytoide DCs, die bekannt sind für ihre $\text{INF-}\alpha$ -Produktion, hauptsächlich TLRs zur Erkennung von Viren. RIG-I spielt hier eine untergeordnete Rolle. Dies zeigt, dass im angeborenen Immunsystem die Mechanismen zur Erkennung von Infektionen für unterschiedliche Zelltypen spezifisch sind.

Zudem gibt es Beobachtungen, die eine Bedeutung von RIG-I in der Embryogenese nahe legen: abhängig vom genetischen Hintergrund starben *RIG-I-knockout*-Mäuse im Embryonalstadium an einer Leberdegeneration. Andere entwickelten sich normal, litten später aber verstärkt an Colitis (Kato *et al.* 2005).

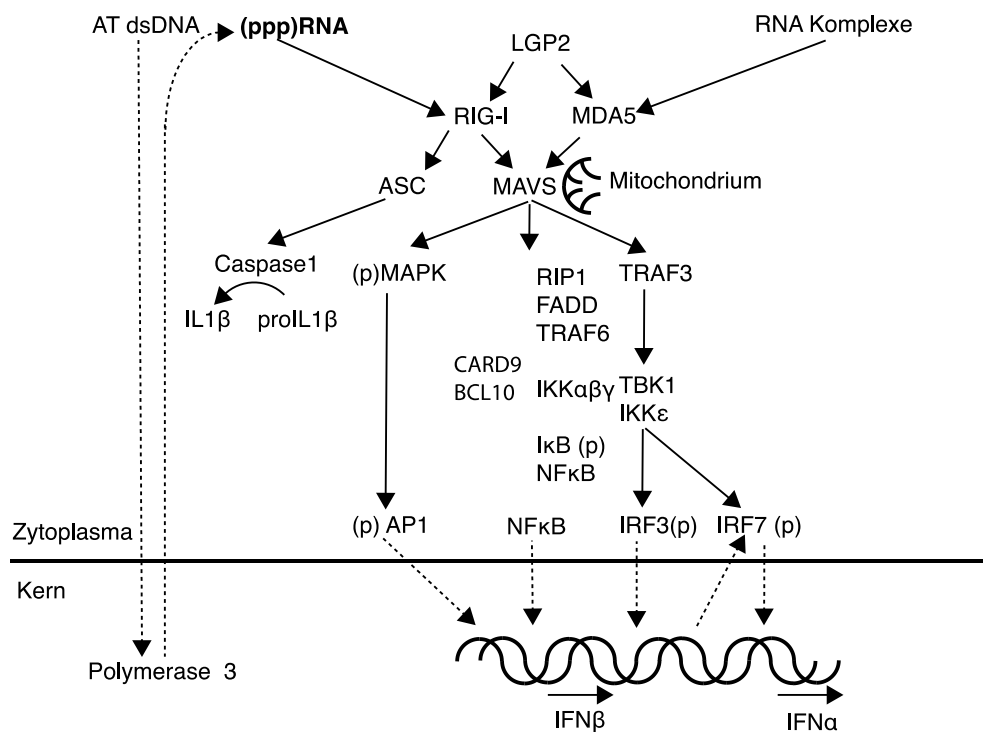


Abbildung 3: Die Signalwege der *RIG-I-like*-Helikasen

RIG-I bindet Triphosphat-RNA (viraler Genese oder Produkte der Polymerase III) und induziert nach Bindung von MAVS einen Signalweg, der zur Expression von Typ-I-IFN führt. Alternativ kann RIG-I unter bestimmten Voraussetzungen über den Adapter ASC auch IL-1β aktivieren. MDA5 bindet RNA-Komplexe und induziert ebenfalls IFN. LGP2 bindet dsRNA, trägt aber keine CARD und beeinflusst RIG-I und MDA5 positiv oder negativ. (adaptiert nach Gerlier und Lyles 2011)

Abgesehen von der direkten Induktion des RIG-I-Signals durch Di- oder Triphosphat-RNA, gibt es noch einen indirekten Weg der Aktivierung: Über die RNA-Polymerase-III kann aus AT-reicher, doppelsträngiger DNA ein Triphosphat-RNA-Molekül gebildet werden, das dann RIG-I-abhängig eine IFN-Antwort stimuliert. Dieser Weg scheint unter anderem bei der Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus relevant zu sein (Ablasser *et al.* 2009).

Die anderen RLH werden hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt, da sie im vorliegenden Projekt nicht untersucht wurden. MDA5 erkennt größere RNA-Komplexe und induziert ebenfalls über MAVS eine IFN-Antwort (Pichlmair *et al.* 2009). Die Funktion von LGP2 ist nicht noch vollständig geklärt. Im Gegensatz zu MDA5 und RIG-I weist es keine CARDs auf und ist demnach nicht zur Signalübermittlung an MAVS in der Lage. Es wird aktuell als ein Regulator von MDA5 und RIG-I gesehen (Satoh *et al.* 2010).

1.2 Beschriebene synthetische RIG-I-Liganden im Vergleich

In diesem Kapitel sollen die bisher beschriebenen, synthetischen Liganden der RLH dargestellt werden. Dazu zählen 5'-Triphosphat-RNA, 5'-Diphosphat-RNA, *poly(I:C)* und Spaltprodukte der RNase-L.

Der erste beschriebene Ligand von RIG-I ist die 5'-Triphosphat-RNA (Hornung *et al.* 2006, Pichlmaier *et al.* 2006). Sowohl eukaryotische als auch virale Polymerasen bilden mRNA, die zunächst ein 5'-Triphosphat-Ende trägt, da die Polymerisation der Nukleotide in 5'-3'-Richtung erfolgt. Durch das *capping* des 5'-Endes der eukaryotischen mRNA weisen endogene RNAs außerhalb des Zellkerns kein freies Triphosphat-Ende auf. Virale RNA-Spezies, die im Rahmen des viralen RNA-Replikationszyklus im Zytoplasma vorkommen, tragen hingegen ein freies Triphosphat-Ende. Auf Grund dieses Unterschiedes wird eine Diskriminierung von viraler und endogener RNA ermöglicht.

RNA-Transkripte, die durch die T7-RNA-Polymerase aus einem DNA-*template* entstehen und ein 5'-Triphosphat-Ende tragen, sind starke Typ-I-IFN-Induktoren (Kim *et al.* 2004). Ein 5'-Triphosphat-Ende allein reicht für die RIG-I-Aktivierung jedoch nicht aus. Das Nukleotid am 5'-Ende muss zusätzlich eine Basenpaarung eingehen. Dieses Merkmal kann entweder durch einen Doppelstrang aus zwei RNA-Molekülen oder durch die Rückfaltung eines Einzelstrangs erfüllt werden (Schlee *et al.* 2009, Schmidt *et al.* 2009).

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass doppelsträngige RNA mit einem 5'-Diphosphat-Ende ebenfalls RIG-I aktiviert, wenn auch schwächer als RNA mit einem 5'-Triphosphat-Ende (Goubau *et al.* 2014): sowohl Genome des *Mammalian*-Reovirus (MRV) mit 5'-Diphosphat-Ende oder 5'-Diphosphat-RNA des *Saccharomyces-cerevisiae*-Virus-L-A, als auch 5'-Diphosphat-RNA aus *In-vitro*-Transkription (IVT) oder chemischer Synthese wurden von RIG-I erkannt. Zudem erwies sich die RIG-Aktivierung nach 5'-Diphosphat-RNA-Stimulation essentiell für die Kontrolle einer Reovirus-Infektion in Zellkultur und Maus. In diesem Manuskript wurde auch gezeigt, dass die *poly*(I:C) Erkennung durch RIG-I auf der Anwesenheit von 5'-Diphosphaten beruht. Damit wird in Frage gestellt, ob die Länge der RNA entscheidet, ob sie durch RIG-I oder MDA5 erkannt wird.

Poly(I:C) ist eine synthetische RNA, die durch *Annealing* von *poly*(Inosin) und *poly*(Cytidin) hergestellt wird, welche wiederum durch die Polynukleotid-Phosphorylase synthetisiert werden. Diese Phosphorylierung führt dazu, dass *poly*(I:C) ein 5'-Diphosphat-Ende trägt. *Poly*(I:C)-RNA wird sowohl von TLR3 als auch von RLH gebunden (Alexopoulou *et al.* 2001, Kato *et al.* 2008).

Zwei Beobachtungen zeigten, dass MDA5 essentiell für die *poly*(I:C) abhängige IFN-Produktion ist (Kato *et al.* 2006, Gitlin *et al.* 2006).

Poly(I:C) einer Länge von über 4 bis 8 Kilobasenpaaren wird vor allem durch MDA5 erkannt. Im Gegensatz dazu aktiviert kürzeres *poly(I:C)* unter 400 Basenpaaren (bp) vor allem RIG-I und nicht MDA5. Demnach folgerten Kato *et al.*, dass die Länge der dsRNA ein entscheidender Faktor ist, ob die Erkennung von *poly(I:C)* über MDA5 oder RIG-I abläuft (Kato *et al.* 2008).

RNase L ist eine Endonuklease und spaltet virale RNA. Die Spaltprodukte aktivieren RIG-I und MDA5. RNase L-defiziente Zellen zeigen eine reduzierte IFN-Antwort nach Stimulation mit *poly(I:C)* und Sendai-Virus (Malathi *et al.* 2007).

Weitere essentielle Charakteristika eines künstlich hergestellten RIG-I-Agonisten wurden 2009 entschlüsselt (Schlee *et al.* 2009, Schmidt *et al.* 2009). Der Agonist ist mindestens 19 Nukleotide lang, trägt ein 5'-Triphosphat-Gruppe und weist eine Doppelsträngigkeit von 7 bis 10 Basen Länge am 5'-Ende auf(siehe Abbildung 4).

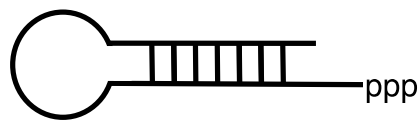


Abbildung 4: Minimales molekulares Muster eines RIG-I-Liganden

RIG-I bindet RNA mit 5'-Triphosphat-Ende, partieller Doppelsträngigkeit und fakultativem *panhandle* (englisch für Pfannenstil) Motiv. (adaptiert nach Schmidt *et al.* 2009)

1.3 Das Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV)

Das Vesicular-Stomatitis-Virus gehört wie auch das Tollwutvirus zur Ordnung der nicht-segmentierten Negativstrang-RNA-Viren, den *Mononegavirales*, und zur Familie der *Rhabdoviridae*. Diese Viren induzieren das seit 1957 bekannte Typ-I-IFN-System. Isaacs und Lindenmann entdeckten, dass hitzeinaktivierte Influenzaviren in Hühnereizellen eine Resistenz gegen die Vermehrung von lebenden Grippeviren induzieren. Auf diese Weise „interferieren“ sie mit der viralen Replikation (Isaacs *et al.* 1957).

Rhabdoviridae infizieren Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten. In der Maus löst VSV eine schwere Enzephalitis aus (Olitsky *et al.* 1934). In Pflanzen replizieren sich die Viren im Zellkern, in Tieren meist im Zytoplasma. VSV kann über seine Antigene in 2 Arten unterteilt werden: die Serotypen VSV *New Jersey* und VSV *Indiana*. In diesem Projekt wurde der VSV vom Serotyp Indiana verwendet (NCBI Sequenz: NC_001560 VSV *Indiana*).

VSV hat fünf proteinkodierende Gene (siehe Abbildung 5): das Nukleoprotein N, das Phosphoprotein P (auch als *Non-structural*-Protein NS bezeichnet), die Polymerase L (*Large*-Protein, L-Protein), das Matrixprotein M und transmembrane Glykoprotein G. Die letzten beiden sind an der Bildung der Hülle von VSV beteiligt.

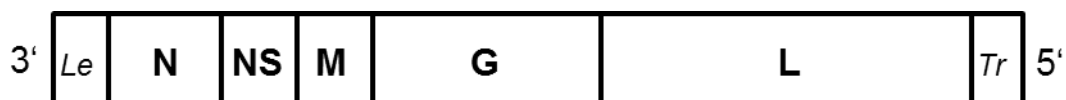


Abbildung 5: Schematische Darstellung des VSV-Genoms

11.161 Basen, die fünf Proteine und zwei untranslatierte Regionen kodieren, bilden das Negativstrang-RNA-Genom des VSV. Die Proteine sind das Nukleoprotein N, das Phospho- bzw. *Non-structura*-Protein P bzw. NS, das interne Matrixprotein M, das transmembrane Glykoprotein G und die Polymerase L. Die untranslatierten Regionen am 3'-und 5'-Ende bezeichnet man als *Leader* (*Le*) und *Trailer* (*Tr*). (adaptiert nach Conzelmann 1998)

Das Genom von VSV wird durch das virale Nukleoprotein (N) verpackt und besteht aus über 11.000 Basen. Im Fall des Referenz-Genoms von VSV-Indiana sind es 11.161 Basen. Das Protein-umhüllte Genom wird auch als Ribonukleoprotein (RNP) bezeichnet. Dieser wird in ein 150 nm langes, Patronen-förmiges Viruskapsid verpackt (Thomas *et al.* 1985). Das RNP ist die Vorlage für Transkription und Replikation durch den viralen RNA-abhängigen-RNA-Polymerase-Komplex. Er besteht aus dem L-Protein, der eigentlichen Polymerase, und dem Kofaktor P.

Der erste Schritt der Replikation von VSV ist die Transkription des viralen Genoms. Der L-P-Komplex bindet das 3'-Ende des Nukleoprotein-verpackten Genoms und beginnt mit der Transkription der *Leader*-RNA. Diese RNA trägt im Gegensatz zu mRNA kein *cap* und ist nicht polyadenyliert. Danach werden die mRNAs von N-, P-, Matrix-, Glyko- und L-Protein gebildet. Die Polymerase fällt während der Transkription mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit an jeder intergenischen Sequenz von ihrer Matrix, sodass ein mRNA Gradient $N > NS > M > G > L$ entsteht. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion, wenn genügend N-Protein in der Zelle entstanden ist, ändert die Polymerase ihre Funktion. Sie produziert dann Positivstrang-RNA-Kopien voller Länge, ohne *caps* und *poly*(Adenosin) [*poly*(A)]-Enden. Die entstehende RNA ist das sogenannte Antigenom. Als Promoter dient hierfür die *Leader*-Region des Genoms. Die Antigenom-Stränge werden ebenfalls von N-Protein umschlossen und binden den L-P-Komplex. Mit dem Antigenom als Vorlage entstehen dann neue Genome voller Länge. Als Promoter dafür dient die *Trailer*-Region am 3'-Ende des Antigenoms. (Conzelmann 1998)

Wie und wann von Transkription auf Replikation umgestellt wird, ist nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass das neu entstehende N-Protein das entscheidende Signal für die Polymerase gibt. In Virus-infizierten Zellen bindet neu produziertes N-Protein nur virale RNA oder *Copy*-RNA. Dies wird durch eine zweite Funktion des P-Proteins reguliert. P bindet N und inhibiert den Kontakt zu zellulärer RNA und die Polymerisation. (Albertini *et al.* 2008)

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Um den menschlichen Organismus in seiner Abwehr von Infektionen durch pathogene Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten unterstützen zu können, muss man die Mechanismen kennen, die folgenden Fragen zugrunde liegen:

- Was wird vom Körper als fremd und potenziell bedrohlich erkannt?
- Wie wird eine effiziente Immunabwehr induziert und wie wird sie kontrolliert, sodass nicht mehr Schaden angerichtet als verhindert wird?
- Wo liegen die Schwachstellen, die es beispielsweise dem Hepatitis-C-Virus erlauben sich über lange Zeit im Körper zu behaupten?

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die Frage, wie der menschliche Körper mit Hilfe von RIG-I Viren erkennt. RIG-I ist ein ubiquitär im menschlichen Körper exprimierter Rezeptor. Er bindet virale RNA und induziert über IFN eine antivirale und über IL-1 und IL-6 eine proinflammatorische Signalkaskade.

In Experimenten mit künstlich hergestellten RNAs konnte ein minimales molekulares Muster identifiziert werden, das erforderlich ist, um RIG-I zu aktivieren. Es besteht aus RNA mit einer Triphosphatmodifikation am 5'-Ende und einem basengepaarten Abschnitt von 10 bis 20 Basen in unmittelbarer Nähe. Es kann sich dabei entweder um dsRNA, die aus zwei gepaarten Strängen besteht, handeln oder um einzelsträngige RNA, die durch *stem-loops* (englisch für Haarnadelstruktur) oder komplementäre Sequenzen in ihrem Verlauf basengepaarte Abschnitte bildet (Hornung *et al.* 2006, Pichlmair *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2009, Schlee *et al.* 2009).

Aus den genannten Arbeiten ist bekannt, welche Eigenschaften synthetisch hergestellte RIG-I-Liganden haben müssen. Dagegen bestehen in der Literatur widersprüchliche Angaben, welche RNA-Spezies in Zellen im Rahmen einer Virusinfektion tatsächlich als RIG-I-Ligand wirken.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, ein experimentelles System zu entwickeln, das die Identifikation RIG-I-gebundener, viraler RNAs in VSV-infizierten Zellen ermöglicht. Dazu sollte

- ein Zellsystem etabliert werden, das induzierbar RIG-I/FLAG exprimiert.
- ein Protokoll entwickelt werden, das die Reisolierung von RIG-I/FLAG-assoziierten viralen RNAs aus Immunpräzipitationen von RIG-I/FLAG ermöglicht.
- mit Hilfe der modernen *Deep-sequencing*-Technologie, die an RIG-I gebundenen RNAs sequenziert werden, um die Liganden von RIG-I in VSV-infizierten Zellen zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Begasungsbrutschrank, Fa. Heraeus (Hanau, DE)
Eismaschine, Fa. Ziegra (Isernhagen, DE)
ELISA-Reader, Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
EV 23,1, Fa. Consort (Turnhout, BE)
Hamilton Spritze, Fa. Hamilton Co. (Reno, Nevada, USA)
Lamin Air Sicherheitswerkbank, Fa. Heraeus (Hanau, DE)
LAS 4000 mini, Fa. Fuji (Düsseldorf, DE)
LightCycler 480, Fa. Roche (Mannheim, DE)
Magnetrührer Combimag, Fa. IKA (Staufen, DE)
Mikroskop (Axiovert 25), Fa. Zeiss (Jena, DE)
Mithras LB 940, Fa. Bertold (Bad Wildbad, DE)
Nanodrop, Fa. Implen (München, DE)
Omnifuge 2 ORS, Fa. Heraeus (Hanau, DE)
pH-Meter, Fa. WTW (Weilheim, DE)
Pipetus, Fa. Hirschmann (Eberstadt, DE)
Power Pac 200 Spannungsgerät, Fa. Biorad (München, DE)
Rollator Assistent RM 5, Fa. Karl Hecht (Sondheim/Röhn, DE)
Scintillation Counter, Fa. Biorad (München, DE)
Thermocycler Modell T3, Fa. Biometra (Göttingen, DE)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40, Fa. Stratagene (Heidelberg, DE)
Thermoshake Laboshake, Fa. Gerhardt (Königswinter, DE)
Vortex VF2, Fa. Bemder & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortexer, Fa. Janke & Kunkel (Staufen, DE)
Waage (LP 6209), Fa. Sartorius (Göttingen, DE)
Wasser-Deionisierungsmaschine, Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, DE)
Western-Blot-Semidry-Transfer-Zelle, Fa. BioRad (München, DE)
Zentrifuge (5417 R), Fa. Eppendorf (Hamburg, DE)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Le Pont de Claix, FR), Bibby Sterilin (Staffordshire, GB), Corning (Corning, USA), Greiner (Frickenhausen, DE) und Falcon (Heidelberg, DE), bezogen.

2.1.2 Computerprogramme

CLC *Genomics Workbench* 5, *Trial version*, Fa. CLCbio (Aarhus, DK)
LightCycler 480 Software, Fa. Roche (Mannheim, DE)
Microsoft Office 2010, Fa. Microsoft (Redmond, USA)

2.1.3 Reagenziensätze

miRNeasy Kit, Fa. Qiagen (Hilden, DE)
Genomed JETSTAR *Plasmid-purification*-Kit, Fa. Genomed (Löhne, DE)
Rneasy Midi Kit, Fa. Qiagen (Hilden, DE)
RNA-Isolations Kit, Fa. Roche (Mannheim, DE)

2.1.4 Reagenzien

Ammonium Acetat, Fa. Ambion/Applied Biosystems (Foster City, USA)
Chloroform Isoamyl Alkohol 49:1, Fa. Fluka/Sigma-Aldrich (München, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO), Fa. Sigma-Aldrich (München, DE)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA), Fa. Sigma-Aldrich (München, DE)
Glykogen, Fa. Ambion/Applied Biosystems (Foster City, USA)
Kristallviolett, Fa. Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Lämmli 2xPuffer, Fa. BioRad (München, DE)
M-MLV Reverse Transkriptase, Fa. Sigma-Aldrich (München, DE)
Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol, Fa. Fluka/ Sigma-Aldrich (München, DE)
Preclearing-beads Sepharose CL-4B, Fa. Sigma-Aldrich (München, DE)
Protein A-Trypan-Blau, Fa. Sigma-Aldrich (München, DE)

2.1.5 Zellkulturmedien

| Name | Verwendung | Inhalt |
|--|--|--|
| DMEM (<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>) | Kultivierung von HEK-293 und MDCK Zellen | 500 ml DMEM 10 Vol% <i>Fetal-Calf</i> Serum (FCS) 100 IU/ml Penicillin 100 g/ml Streptomycin 1,5 mM L-Glutamin |
| DMEM HB (<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> mit Hygromycin und Blasticidin) | Kultivierung von RIG-I/FLAG-exprimierenden HEK-Flp-In TREX- Zellen | 500 ml DMEM 10 Vol % FCS 100 IU/ml Penicillin 100 µg /ml Streptomycin 1,5 mM L-Glutamin 100 µg/ml Hygromycin 15 µg/ml Blasticidin, |
| BHK (<i>Baby hamster kidney</i>) Medium | Kultivierung von BHK-21 Zellen | 500 ml GMEM 10 Vol % FCS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1 Vol % Tryptose Phosphat |
| Kryo Medium | Konservierung von Zellen | FCS 10 Vol % DMSO |
| Optimem Medium | Transfektion, Infektion | (keine Zusätze) |

2.1.6 Puffer

| Name | Verwendung | Inhalt |
|---|--|--|
| RNA-IP Lyse Puffer (adaptiert nach Meister <i>et al.</i> 2005) | Lyse von Zellen für Immunpräzipitation, Waschen der <i>beads</i> | 150 mM TRIS pH 7,5 1,5 mM MgCl 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM NaF 0,5 mM DTT 0,25 % Nonident P40 1% Fermentas Ribolock RNase-Inhibitor 1% Proteinase Inhibitor (Leupeptin, Peptstatin, Chymostatin) |
| Elutionspuffer | Immunpräzipitation: Elution | 5 mM TBS 10% Fermentas Ribolock RNase-Inhibitor |

2.1.7 Antikörper

| Name | Beschreibung | Spezifität | Hersteller |
|----------------------|---|-----------------------|------------------------------|
| Anti-FLAG M2 | Monoklonaler Maus Antikörper | FLAG-Peptid | Sigma Aldrich, (München, DE) |
| Anti-FLAG M2 Agarose | <i>Bead</i> -gekoppelter monoklonaler Maus Antikörper | FLAG-Peptid | Sigma Aldrich, (München, DE) |
| Anti-Mouse HRP | <i>Horse-radish-peroxidase</i> -gekoppelter monoklonaler Antikörper | Murine Immunglobuline | Sigma Aldrich, (München, DE) |

2.1.8 Plasmide

| Plasmid Name | RIG-I-1x FLAG-pRTS | 3x FLAG-RigI-pcDNA5 |
|-----------------------------|--|--|
| Funktion | Transiente RIG-I Expression | Stabile RIG-I Expression in HEK-Flp-In T-Rex-Zellen (HEK-Flp-In-RIG-I/FLAG-Zellen) |
| Konstruktion | Humanes RIG-I, <i>full length</i> , Wildtyp; Expression induzierbar mit Doxycyclin, simultane GFP Expression | 3x FLAG, humanes RIG-I, <i>full length</i> induzierbar mit Doxycyclin |
| <i>Background</i> -Vektor | pRTS/750 | pcDNA5 |
| Bakterielle Selektion | Ampicillin | Ampicillin |
| Selektion in humanen Zellen | Hygromycin | Hygromycin |
| Epitop- <i>tag</i> | 1x FLAG | 3x FLAG |
| <i>cloning-sites</i> | Sfi | FseI, AscI |
| <i>Tag</i> -Lokalisation | C | N |

2.1.9 Oligonukleotide

| Name | Beschreibung | Funktion | Herkunft |
|------|--|--|---------------------|
| T200 | 220 bp RNA aus dem <i>Yellow-Fluorescence-Protein</i> -Gen (YFP) | 5'-Triphosphat-Ende als RIG-I Stimulus | IVT aus DNA-Vorlage |

2.1.10 RT-PCR Primer

| Ziel-Gen | Primernamen | Primersequenzen (5'-3') | Position VSV <i>Copy</i> -Genom |
|---------------------------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------------|
| intergenische Region <i>Leader</i> /N | VSV leN links | cgaagacaacaaccattattatca | 2 - 27 |
| | VSV leN rechts | gttgtaaatgattctcttgactgtaac | 70 - 96 |
| N-Protein | VSV N links | aataaccggaatgtctacagaagatg | 766 - 786 |
| | VSV N rechts | tctgcaactctcgggtcaa | 811 - 830 |
| NS-Protein | VSV NS links | gcagagtgcacattgaagc | 1858 - 1877 |
| | VSV NS rechts | agttatctggcgctcctcat | 1897 - 1917 |
| M-Protein | VSV M links | gcgaaggcagggttatt | 2653 - 2670 |
| | VSV M rechts | gctctggtacattgagcatgg | 2698 - 2718 |
| intergenische Region M/G | VSV MG links | aacaatccccggtttactca | 2963 - 2982 |
| | VSV MG rechts | tttcatagggatagaaaagacagga | 3018 - 3042 |
| G-Protein | VSV G links | tggttcgagatggctgataa | 3831 - 3850 |
| | VSV G rechts | acttgacccttctgggcatt | 3880 - 3899 |
| L-Protein | VSV L1 links | ccttagaagggaattggaagaa | 8765 - 8787 |
| | VSV L1 rechts | tctgccgacttgataggattg | 8804 - 8824 |
| | VSV L2 links | ccagcaatcattcccgatta | 10.708 - 10.727 |
| | VSV L2 rechts | ccacttctgcttgatcctcct | 10.750 - 10.771 |
| <i>Trailer-Sequenz</i> | VSV-tr links | ggctttgatccttaagacc | 11.000 - 11.118 |
| | VSV-tr rechts | gacgaagaccacaaaacc | 11.142 - 11.161 |

2.2 Zellkultur

Die Zellexperimente erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer *Laminar-air-flow*-Werkbank. Alle verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37° C Temperatur, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Luft-Gemisch kultiviert.

2.2.1 HEK-293-Zellen

Die *Human-embryonic-kidney* (HEK)-Zellen stammen aus humanem embryonalen Nierengewebe einer Patientin nach induziertem Abort. Die Bezeichnung 293 entspricht der Nummer in der Liste der Experimente von Frank Graham, der die HEK-Zellen mit Adenovirus Typ 5-DNA transfizierte (Graham *et al.* 1977).

Die endogene Ausstattung der Zellen an Proteinen gewährleistet basale Lebensvorgänge, wie Zelladhärenz und -teilung. Durch die Möglichkeit der Gen-Transfektion und -Expression wurden die Zellen zu wichtigen Modellzellen der Naturwissenschaften. Hinsichtlich ihrer endogenen RIG-I-Expression zeigen die HEK-Zellen eine große Varianz.

2.2.2 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen

Lipofektamin bildet mit negativ geladenen Nukleinsäuren liposomale Komplexe, welche die Zellmembran passieren können. Die Komplexierung mit Lipofektamin wurde in dieser Arbeit verwendet, um Plasmid-DNA oder immunstimulatorische RNA in das Zytoplasma von Zellen einzubringen. Um 200 ng RNA zu transfizieren wurde die RNA mit 0,5 µl Lipofektamin 2000 und 25 µl OPTIMEM gemischt und nach 5 Minuten Inkubation tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert.

2.2.3 BHK-Zellen

Die *Baby hamster kidney* (BHK)-Zellen wurden zur Kultivierung von VSV und zur Bestimmung der VSV-Konzentration im *plaque-assay* verwendet. BHK-Zellen wurden in BHK-Medium kultiviert.

2.2.4 Flp-In-T-Rex-Zellen mit Tetrazyklin-abhängiger RIG-I-Expression

Das Flp-In-T-Rex-System ermöglicht die Generierung einer Zelllinie, die stabil, und im vorliegenden Fall zudem unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters, ein bestimmtes Protein exprimiert. Gemäß dem Herstellerprotokoll geht man in folgender Weise vor (siehe Abbildung 6).

Zuerst werden Flp-In-T-Rex-Wirtszellen hergestellt, dann entsteht in einem zweiten Schritt die Flp-In-T-Rex-Zelllinie. Im vorgestellten Projekt erfolgte die Herstellung dieser Flp-In-T-Rex-Wirtszellen bei einem Kooperationspartner. Die Flp-In-T-Rex-Zellen wurden von der Fa. Invitrogen erworben.

Zur Herstellung der Flp-In-T-Rex-Wirtszellen werden unabhängig voneinander zwei Plasmide in eine Säugetier-Zelllinie, im vorliegenden Fall HEK-293-Zellen, integriert. Das erste Plasmid (pFRT/lac Zeo) trägt unter Kontrolle des SV40 Promoters die *Flp-Recombination-Target* (FRT)-Stelle, verknüpft mit einer Zeocin-Resistenz, sowie einer β -Galaktosidase. Die FRT-Stelle dient als Binde- und Schnittstelle für die FRT-Rekombinase und ist einem ATG-Startcodon des lacZ-Zeocin-Fusionsgens nachgeschaltet. Über die Zeocin-Resistenz wird selektioniert. Klone mit einer einzelnen aufgenommenen FRT-Stelle werden per Southern Blot ausgewählt.

Die Integration in das Genom der FRT-Stelle erfolgt an einem zufälligen Ort. Da die Lokalisation Einfluss auf die transkriptionale Aktivität hat, wird letztere über einen β -Galaktosidase-abhängigen Farbumschlag nach Substrat-Zugabe überprüft. Mehrere Klone mit der höchsten β -Galaktosidase-Aktivität werden ausgewählt. Durch Transfektion des zweiten Plasmids (pcDNA6/TR) entstehen aus diesen Klonen die Flp-In-T-Rex-Wirtszellen: Dieses pcDNA6-Plasmid exprimiert über einen CMV-Promoter einen Tetrazyklin-Repressor und trägt eine Blasticidin-Resistenz. Über die Resistenzen gegen Blasticidin und Zeocin werden die Zellen nach der Transfektion selektioniert.

Die Generierung von RIG-I/FLAG-exprimierenden Zellen wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Dominik Höchter (ebenfalls in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der LMU München) durchgeführt. Aus den Wirtszellen entsteht in folgender Weise die RIG-I/FLAG-Flp-In-T-Rex-Zelllinie: Ein pcDNA5-Expressionsvektor trägt nach entsprechender Ligation das zu exprimierende Gen, im vorliegenden Fall RIG-I/FLAG. Dieses unterliegt der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters. Das pcDNA5 Plasmid trägt eine Hygromycin-Resistenz, die jedoch kein eigenes ATG-Startcodon und keinen Promoter hat. Über die Flp-Rekombinase-abhängige DNA-Rekombination wird der pcDNA5-Expressionsvector (pcDNA5/FRT) in das Genom der Flp-InT-Rex integriert. Zeitgleich zum pcDNA5-Plasmid wird über ein weiteres Plasmid das Gen der Flp-Rekombinase kotransfiziert (pOG44). Dieses ist einem CMV-Promoter nachgeschaltet. Im Fall einer erfolgreichen DNA-Rekombination durch die Flp-Rekombinase erhält das Hygromycin-Resistenz-Gen dann ein ATG-Startcodon und den Promoter. Das RIG-I/FLAG Konstrukt unter dem Tetrazyklin-induzierbaren Promoter wird ins Genom integriert. Das Zeocin-Gen wird hingegen inaktiviert.

Zusammenfassend tragen die RIG-I/FLAG Flp-In-T-Rex-Zellen den Tetrazyklin-Repressor, eine Resistenz gegen Blasticidin und Hygromycin, eine Sensitivität für Zeocin und das RIG-I/FLAG-Konstrukt unter dem Tetrazyklin-sensitiven Promoter.

Die Expression von RIG-I/FLAG wurde mit 1 µg/ml Tetrazyklin induziert. Dieses bindet den Repressor und ändert dessen Konformation, sodass der Operator freigegeben wird. Nach 24 Stunden kann die Expression im Western Blot überprüft werden.

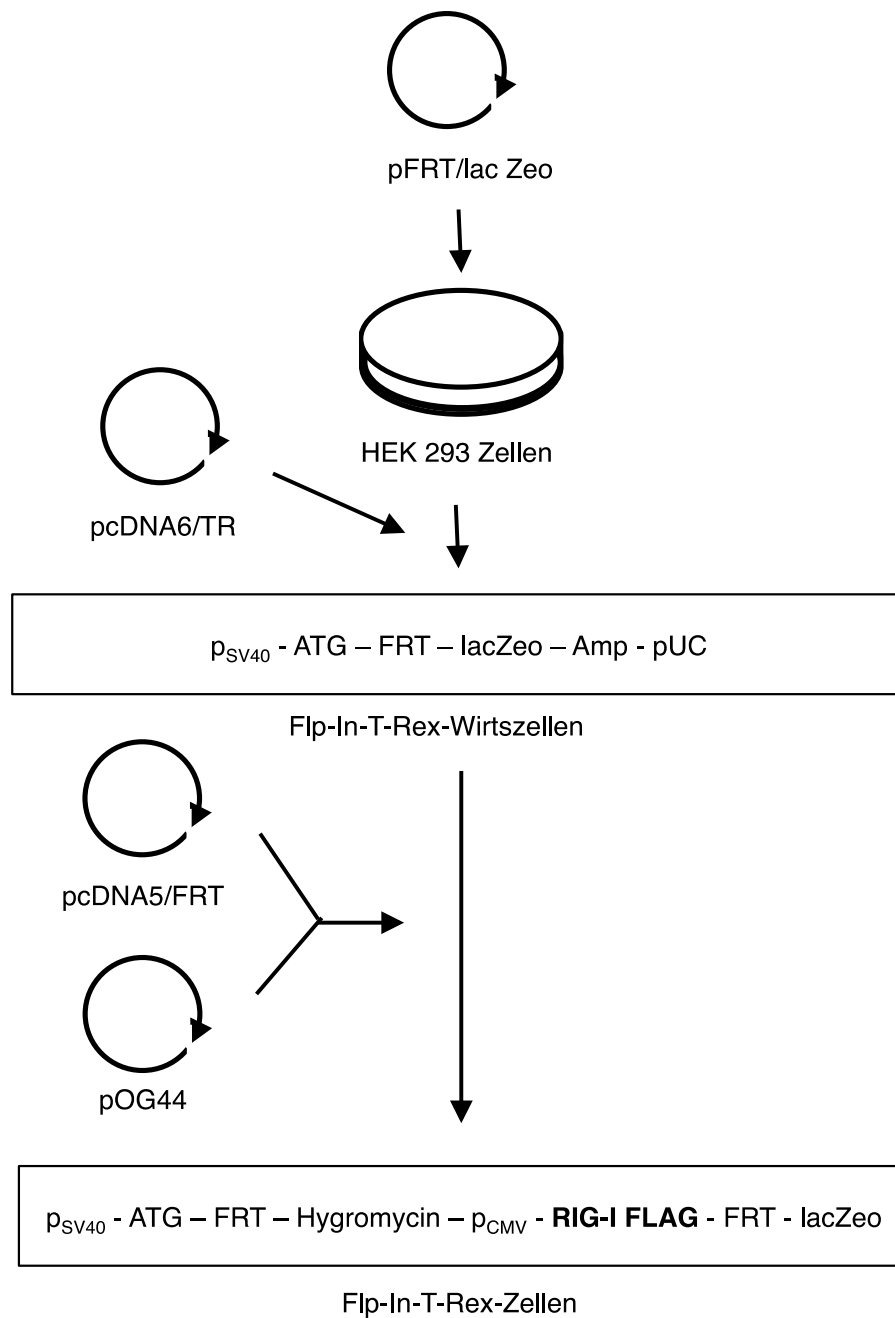


Abbildung 6: Generierung der Flp-In T-Rex-Zellen

Diese Abbildung wurde nach der Vorlage der Fa. Invitrogen erstellt. (adaptiert nach Flp-In™ T-REx™ Core Kit, User Guide, „Diagram of the experimental outline“ Seite 9, Version August 2012)

2.3 Virologische Methoden

2.3.1 Kultivierung des Vesicular-Stomatitis-Virus

VSV wurde in BHK-21 Zellen in *Glasgows Modified Eagle Medium* (GMEM) unter Zugabe von 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Tryptose kultiviert. Zuerst wurden 5 bis 10×10^6 BHK-21 Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert. Nachdem die Zellen ihre typische Morphologie eingenommen und eine hohe Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Dann wurde mit einem Inoculum von 10^{-4} MOI VSV in Optimem infiziert. Am Ende einer einstündigen Adsorptionsphase bei Raumtemperatur wurde das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und erneut Optimem auf die Zellen gegeben. Nach 2 bis 4 Tagen Inkubation bei 37° C verloren die Zellen ihre Adhärenz, was durch leichtes Beklopfen der Schale unterstützt wurde. Das Medium mit den gelösten Zellen wurde in 50 ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde in sterile 0,5 oder 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße aliquotiert, die als zukünftiges Virus-Inoculum bei -80° C gelagert wurden.

2.3.2 Plaque-assay für VSV

Die Konzentration der eingefrorenen Virus-Lösung wurde mit dem *plaque-assay* bestimmt. Die sogenannten *plaques* (englisch für Höfe) sind Löcher im Zellrasen infizierter Zellen. Sie entstehen durch einen zytopathischen Effekt in Virus-infizierten Zellen. Ein *plaque* repräsentiert eine infizierte Ausgangszelle. Eine Agaroseschicht verhindert die freie Diffusion der Viren.

Für den *plaque-assay* werden benötigt:

- GMEM
- 12×10^6 BHK-21 Zellen in 2 x 6-*well* Platten
- Crystal Violet Farbstoff
- 1 % Agaroselösung in PBS

Je 10^6 BHK-21 Zellen wurden in 12 6-*wells* ausplattiert. Nach 18 Stunden hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 90%. Zur Vorbereitung der Infektion wurde eine Verdünnungsreihe der Viruslösung von 10^{-1} bis 10^{-10} in Optimum angefertigt.

Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Infektion mit 1 ml der Viruslösung pro 6-*well*. Die Ausbreitung der Viren wurde durch geringfügige Bewegung der Zellenplatten unterstützt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde eine 1%-Agarose-Lösung in PBS vorbereitet. Das Inoculum wurde vollständig entfernt und es folgte ein weiteres Waschen mit PBS. Die gelöste Agarose wurden dann zu gleichen Teilen mit dem GMEM Zellmedium vermischt. Nachdem die Temperatur der Lösung auf 40° C abgekühlt war, wurde die Lösung auf die *wells* verteilt.

Am Ende einer Inkubation von 48 Stunden bei 37° C im Brutschrank folgte, sobald sich mikroskopisch *plaques* zeigten, die Auswertung. Die Agarose wurde mittels Spatel angehoben und entfernt. Dann wurden pro *well* 2 ml Kristallviolett hinzugegeben und die Zellen bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde inkubiert. Nach Entfernung des Farbstoffes wurden die Zellen dreimal mit Wasser aus der Leitung gewaschen.

Durch das Waschen wurden die *plaques* sichtbar. Die Konzentration an *plaque-forming units* (PFU) pro ml der verwendeten Viruslösung kann aus der Anzahl der *plaques* und der bekannten Verdünnung der Viruslösung im entsprechenden *well* berechnet werden. Das Verhältnis aus PFU pro Zelle zu Beginn einer Infektion wird als *Multiplicity of infection* (MOI) bezeichnet. Bei 1 MOI gelangt pro eingesetzter Zelle je ein Viruspartikel in das Infektionsmedium.

2.3.3 Infektion von HEK-293-Zellen mit VSV

Für die Infektion von HEK-Zellen mit VSV wurde ein Inoculum mit der Viruskonzentration von 1 MOI in Optimum angesetzt. Nach Entfernung des Mediums und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 9 Stunden mit dem Inoculum inkubiert. Vor der Zell-Lyse wurden die Zellen wiederum dreimal mit PBS gewaschen.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteine und Nukleinsäuren aus dem Zytoplasma der Zelle biochemisch analysieren zu können, werden die Zellmembranen mit einem Lysepuffer aufgelöst. Der Einsatz von Proteinase- und Nukleasehemmstoffen und die Arbeit bei niedriger Temperatur (Lysepuffer 4° C kalt, Lagerung des Lysats auf Eis, Verwendung auf 4° C vorgekühlter Zentrifugen) sollen verhindern, dass die Zielstrukturen degradiert werden. Vor allem für die spätere Koimmunpräzipitation von Protein-RNA-Komplexen erwies sich dies als essentiell.

Ausgangspunkt der Lyse sind im Allgemeinen adhärente Zellen in Nährmedium. Im vorliegenden Fall hatten die Zellen jedoch ihre Adhärenz durch die Beeinträchtigung im Rahmen der viralen Infektion meist verloren. Noch adhärente Zellen wurden durch Beklopfen des Zellbodens abgelöst. Das Medium (einschließlich der darin schwimmenden Zellen) wurde abgetragen und die Zellen dreimal mit 4° C kaltem PBS gewaschen. Dann wurden 10 bis 50 x 10⁶ HEK-Zellen für 10 Minuten mit 1 ml Lysepuffer inkubiert. Repetitives Auf- und Abpipettieren mittels steriler Kanüle unterstützte die Lyse mechanisch. Der Erfolg der Lyse zeigte sich im Mikroskop durch die freie Diffusion der Zellkerne im Lysat.

2.4.2 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen. Zunächst wurden die Proteine in einem Puffer denaturiert und die spezifische Ladung neutralisiert. Durch Zusatz von *Sodium Dodecylsulfate* (SDS) wurden die Proteine negativ geladen. Die Proteine wurden dann entsprechend ihrer Größe im Polyacrylamid-Gel unter Anlegen einer Spannung von 100 V aufgetrennt.

Unterdessen wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran vorbereitet: Die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit gelöstem Milchpulver gesättigt (10 g Milchpulver in 200 ml TBST). Im *Semidry*-Verfahren und bei 30 mA Strom pro Gel folgte dann der Transfer der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran. Die Membran wurde mit dem proteinspezifischen Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Membran für 4 bis 10 Stunden mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser zweite Antikörper ist mit seinem Fc-Teil an das HRP- Enzym gekoppelt und bindet den ersten. Das Enzym setzt im Fall einer Bindung beider Antikörper ein lichtemittierendes Substrat um. Die Chemilumineszenz wurde mit dem LAS Image Reader detektiert.

2.4.3 Koimmunpräzipitation

Mit der Koimmunpräzipitation (englisch *co-immunoprecipitation*, Co-IP) können aus Zelllysaten spezifisch Proteine und an diese assoziierte Moleküle, zum Beispiel andere Proteine, RNA oder DNA, aufgereinigt werden (siehe Abbildung 7).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Co-IP verwendet, um an RIG-I-gebundene RNA zu detektieren. Die Co-IP erfolgt in direkter Weise durch proteinspezifische Antikörper oder indirekt über ein Protein-*tag* (englisch für Epitop-Markierung), das an das eigentliche Zielprotein gebunden ist.

Vorteil der direkten Co-IP ist die Aufreinigung physiologischer Proteine. Die indirekte Co-IP dagegen ist in Form kommerziell erhältlicher Systeme mit hoher Bindungsaffinität zwischen Antikörper und *tag* den direkten Systemen hinsichtlich der Effektivität der Co-IP überlegen.

Das vorliegende Projekt nutzte die indirekte Variante. Als *tag* wurde das FLAG-Peptid verwendet, das von einem Agarose-*bead*-gekoppelten Anti-FLAG-Antikörper gebunden wurde (*bead* englisch für Kügelchen). Dieser *bead* erlaubt es den daran hängenden Komplex aus Antikörper und Protein bei geringer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 1000 g zu isolieren. Nach Zugabe eines Überschusses des *Tag*-Peptides wird der Protein-Komplex aus der Antikörperbindung gelöst. Das aufgereinigte Protein und die daran gebundene RNA stehen so für weitere Analysen zur Verfügung.

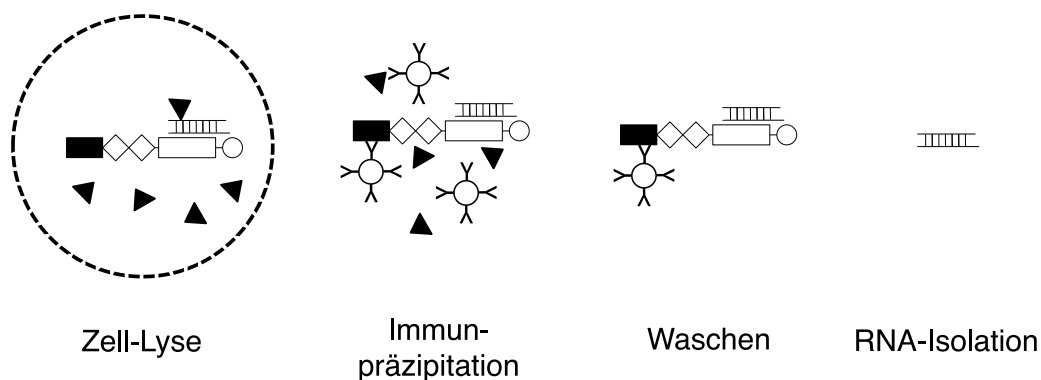


Abbildung 7: Koimmunpräzipitation

Zellen mit dem Komplex aus Protein (RIG-I/FLAG) und RNA werden lysiert. Nach der Lyse wird das Zielprotein über spezifische, *bead* gekoppelte Antikörper gegen das FLAG-*tag* (schwarzes Rechteck) angereichert, gewaschen und die Protein-gebundene RNA isoliert.

Im Folgenden wird das bereits veröffentlichte Protokoll der Co-IP von RIG-I ausgeführt (Schmidt *et al.* 2014). Die angegebenen Volumina beziehen sich auf einen Ansatz, der die Identifikation von RIG-I im Western Blot und den RIG-I abhängigen Nachweis viraler RNA in der RT-PCR gewährleistet (für den einmaligen Ansatz des Experiments mit anschließendem *deep sequencing* wurde eine Ausgangsmenge von insgesamt 150 Flaschen a 650 ml Fassungsvermögen verwendet).

Zunächst wurden in 9 Zellkulturflaschen mit je 250 ml Fassungsvermögen 15 ml DMEM und HEK-Flp-In-RIG-I/FLAG-Zellen in einer Konzentration von 10^7 HEK-Zellen pro Flasche ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde in 6 der 9 Flaschen durch Zugabe von Tetrazyklin ($1 \mu\text{g/ml}$) die Expression von RIG-I induziert (für die Bedingungen „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ und „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“).

Am dritten Tag wurden die Zellen in drei der induzierten und in drei der nicht induzierten Zellkulturflaschen mit 1 MOI VSV infiziert (drei der induzierten Flaschen für „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ und die drei der nicht induzierten für „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“).

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Das Medium wurde abgenommen und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 30 ml OPTIMEM dazugeben. Es folgte die Hinzugabe von Viruslösung in einer Konzentration von 1 MOI. Die nicht infizierte Bedingung wurde mit DMEM inkubiert. Nach 8 Stunden wurde der Lysepuffer vorbereitet und die Zentrifugen wurden auf 4°C vorgekühlt.

Die Zellen wurden nach 9 Stunden lysiert: Durch sanftes Beklopfen der Zellkulturflasche mit den Fingern wurden die Zellen vom Boden der Flasche gelöst und dann in 50 ml Zentrifugenbehälter überführt. Nach der Zentrifugation für vier Minuten bei 400 g und 4°C befanden sich die Zellen als Pellet am Boden des Gefäßes. Dann wurden die Zellen in 20 ml gekühltem PBS gewaschen und erneut bei 400 g zentrifugiert. Der sogenannte RNA-IP-Lysepuffer wurde zur Lyse der Zellen eingesetzt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer aufgenommen, zehnmal hinauf und herunter pipettiert und dann mit einer 5 ml Spritze und Kanüle (18 G) dreimal hinauf und herunter gezogen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 30 Minuten bei 15.000 g und 4°C .

In der Zwischenzeit wurden der Western Blot und die *preclearing beads* vorbereitet. Das *preclearing* entfernt einen Teil der RNAs die unspezifisch an Proteine, so auch Antikörper, binden. Pro Bedingung („RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“, „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“, „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“) wurden 0,5 ml *Slurry*-Sepharose für das *preclearing* eingesetzt, die zweimal mit 5 ml Lysepuffer gewaschen wurden.

Nach der Zentrifugation des Lysats wurde der Überstand in neue 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. Zudem wurde die erste Probe für den Western Blot abgenommen („Lysat“). Die gewaschenen Sepharose *beads* wurden dann für das *preclearing* auf das Lysat gegeben und für 1 Stunde bei 4° C rollend inkubiert.

Während dieser Zeit wurden die Anti-FLAG-*beads* zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Pro Bedingung wurden 300 µl eingesetzt. Dann wurde zum Beenden des *preclearing* die Sepharose *beads* abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Gefäß überführt. Die Anti-FLAG-*beads* wurden hinzugegeben und die Lösung wurde anschließend 2 Stunden rollend bei 4° C inkubiert. 10 Minuten vor Ende dieser Zeit wurde das in der anschließenden Elution benötigte FLAG-Peptid aufgetaut und auf Eis gelagert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die *beads* bei 1000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert und die zweite Western-Blot-Probe („Überstand“) abgenommen. Die *beads* wurden siebenmal, rollend bei Raumtemperatur, im Lysepuffer gewaschen. Am Ende jedes Waschschrilles wurden die *beads* für 30 Sekunden bei 1000 g zentrifugiert und der Puffer wurde gewechselt.

Der nächste Schritt war die Elution. Dazu wurde im letzten Waschschrill möglichst der komplette Waschpuffer entfernt. Die *beads* wurden in 0,5 ml Puffer resuspendiert. Die gelösten *beads* wurden in eine Aufreinigungssäule je Bedingung überführt, die in einem zugehörigen Mikroreaktionsgefäß steckte. Der Puffer wurde nach Zentrifugation für 30 Sekunden bei 1000 g entfernt. Das Mikroreaktionsgefäß unter der Säule wurde ausgetauscht. Jetzt wurden pro Bedingung 10 µl FLAG-Peptid einer Konzentration von 100 µg/ml und 2 µl Ribolock dazugeben.

Die Säulen wurden für 10 Minuten auf einen Schüttler montiert. Während des Schüttelns wurde die Elutionslösung aus 100 µl TBS und 5 µl Ribolock RNase-Inhibitor vorbereitet. Nach dem Schütteln wurden pro Bedingung 30 µl TBS mit Ribolock auf die Säulen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 g für 3 Minuten. Aus dem fertigen Eluat wurden 5 µl für den Western Blot entnommen (Immunpräzipitat, „IP“). Anschließend wurden das Eluat bei -80° C weggefroren.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Bakterien-Transformation

Die Vermehrung von DNA-Plasmiden erfolgt in sogenannten kompetenten Bakterien. Kompetenz bedeutet in diesem Zusammenhang die Eigenschaft DNA aufnehmen zu können. Die entsprechenden Bakterien werden mit den Plasmiden transformiert und amplifizieren die aufgenommene DNA während der Replikation der endogenen DNA.

Im Folgenden wird das Protokoll einer Transfektion beschrieben. Kompetente Bakterien vom *E. coli*-Stamm DH5α (im 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß) wurden auf Eis inkubiert. Dann wurde 1 ng DNA eines Plasmids, auf dem eine Antibiotikaresistenz kodiert ist (gegen Ampicillin oder Kanamycin, je nach Plasmid) hinzugegeben. Die Resistenz ermöglicht eine Selektion, sodass nach Zugabe des Antibiotikums nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, überleben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde ein sogenannter Hitzeschock bei 42° C für 1 Minute im Heizblock durchgeführt. So wird die Aufnahme der DNA durch eine wärmeinduzierte Porenbildung in der bakteriellen Membran begünstigt. Dann wurde 1 ml LB Bakterienmedium ohne Antibiotikum hinzugegeben und die Bakterien wurden für 1 Stunde bei 37° C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde das Mikroreaktionsgefäß für 1 Minute bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet im restlichen Medium, das beim Abkippen im Gefäß bleibt, resuspendiert.

Diese Lösung wurde auf eine Petrischale mit dem selektiven Antibiotikum in Nährmedium gegeben. Nur resistente Bakterien, die das Plasmid mit der passenden Antibiotikaresistenz aufgenommen haben, überleben und wachsen. Die Bakterien wurden meist über Nacht, mindestens jedoch für 6 bis 10 Stunden bei 37° C auf diesen Medien inkubiert. Dann wurden einzelne, gewachsene Bakterienkolonien ausgewählt und für die Plasmidpräparation eingesetzt.

2.5.2 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation reinigt DNA-Plasmide auf, die in Bakterien vermehrt wurden. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein einzelner Klon der oben beschriebenen Bakterienplatte aufgenommen und in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß mit Bakterienmedium und dem Antibiotikum resuspendiert. Dann wurde der Deckel des Gefäßes mehreren Stichen durch eine sterile Kanüle (18 G) durchlöchert, um den Bakterien ausreichend Sauerstoff für ihr Wachstum zuzuführen. 2 bis 4 Stunden nach diesem Vorgang, abhängig vom Trübheitsgrad des Mediums, wurde die Suspension in einen 1-Liter-Kolben mit 300 ml LB Medium und Antibiotikum überführt. Dieser wurde für 16 Stunden in einer Schüttelvorrichtung bei 37° C inkubiert. Das Durchmischen der Flüssigkeit gewährleistete wiederum die Versorgung der Bakterien mit Sauerstoff. Tags darauf wurde aus den Bakterien die Plasmid-DNA mit Hilfe des *Jetstar Kits* der Fa. Genomed gemäß des Herstellerprotokolls isoliert.

2.5.3 Polymerase-chain-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-*chain*-Reaktion (PCR) ist es möglich, aus einer geringen Menge an DNA, einen spezifischen Bereich der Nukleinsäure zu amplifizieren. Benötigt wird eine thermostabile Polymerase, die auch durch mehrfache, extreme Temperaturerhöhungen nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt wird. Außerdem werden kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer eingesetzt, die spezifisch an die Ausgangs-DNA-Sequenz binden. Sie bilden den Ansatz- und Endpunkt für die Polymerase und begrenzen so den Bereich, der amplifiziert wird. Zudem werden Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine für den neuen DNA-Strang, geeignete Pufferlösungen und Mg^{2+} -Ionen als Kofaktoren der Polymerase verwendet.

Die PCR läuft in drei Schritten ab:

1. Denaturierung: Damit die Primer binden können trennt man die Basenpaarung der DNA auf, indem man die DNA auf 95° C erhitzt.
2. Hybridisierung: Die Primer binden an ihre Zielsequenz auf der Ausgangs-DNA.
3. Polymerisation: Die Polymerase verlängert das 3'-Ende des Primers.

Dann wird die neu synthetisierte DNA wieder in Einzelstränge aufgetrennt, um den nächsten Zyklus zu starten. Die Temperatur für die Hybridisierung hängt von der Schmelztemperatur der Primer ab. Im Allgemeinen liegen sie zwischen 52° C und 60° C. Je kälter die Temperatur, desto unspezifischer binden die Primer. Je wärmer, desto weniger wahrscheinlich, aber desto spezifischer ist die erfolgreiche Hybridisierung.

Im vorliegenden Projekt wurde die PCR zur Klonierung von DNA-Plasmiden mit den folgenden Reagenzien durchgeführt: 37,5 µl Wasser, 5 µl 210 x Pfu-Puffer, 1 µl Pfu-Polymerase, 1 µl dNTPs, 1,25 µl von jedem der beiden Primer und 3 µl DNA.

2.5.4 *In-vitro-Transkription*

Die *In-vitro*-Transkription (IVT) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur enzymatischen Herstellung von RNAs im zellfreien Milieu. Dabei wird ausgehend von einem DNA-Strang mit Hilfe DNA-abhängiger RNA-Polymerasen ein RNA-Strang mit einer zum *template* (englisch für Vorlage)-Strang komplementären Sequenz synthetisiert. Im hier vorliegenden Projekt wurde die T7-RNA-Polymerase verwendet. Als Besonderheit weist die *in-vitro*-transkribierte RNA (IVT-RNA) am 5'-Ende eine Triphosphat-Gruppe auf, die beim Einbau des ersten Nukleotids entsteht.

Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz beinhaltete 6 µl H₂O, 2 µl 10-fach T7-Puffer, 8 µl NTPs, 2 µl T7-Polymerase und 4 µl DNA. Die Reaktion lief im Inkubator bei 37° C für 12 Stunden ab. Als Vorlage wurde ein Plasmid mit dem Gen für das *Yellow fluorescent protein* (YFP) unter einem T7 Promoter verwendet. Die IVT startet am Promoter für die T7-Polymerase und produzierte im vorliegenden Fall ein 220 Basen langes RNA-Stück. Die Tatsache, dass das RNA-Produkt der Polymerase mit einem 5'-Triphosphat beginnt, war für die anschließenden Experimente essentiell: RIG-I erkennt 5'-Triphosphat-RNA.

2.5.5 *RNA-Isolation mit Phenol-Chloroform*

Mit der Phenol-Chloroform-Methode lässt sich RNA aus verschiedenen Ausgangsmaterialien aufreinigen. Für die Isolation von Gesamt-RNA wird das Lysat von Zellen verwendet. Mit der Methode kann aber auch RNA aus Protein-RNA-Komplexen, wie man sie beispielsweise mit der Co-IP gewinnt, aufgereinigt werden. Die Methode hat den Vorteil, dass größere Mengen an RNA isoliert werden können, als bei der Aufreinigung über Säulen-basierte Systeme.

Ein weiterer Vorzug ist die RNase-Inhibition durch das Phenol. Pro Mikroreaktionsgefäß von 1,5 ml Volumen wurden 100 µl Lysat aus dem Eluat der Co-IP eingesetzt. Darauf wurden 200 µl Phenol-Chloroform mit saurem pH zwischen 4 und 5 gegeben. Nach Mischen und fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde für 10 Minuten bei 4400 g und 4° C zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, abhängig vom Ausgangsmaterial teilweise in der Mitte durch eine schmale dritte Phase getrennt (siehe Abbildung 8). Oben befand sich die RNA in der wässrigen Phase, in der Mitte die DNA und unten in der sogenannten organischen Phase die Proteine des Lysats.

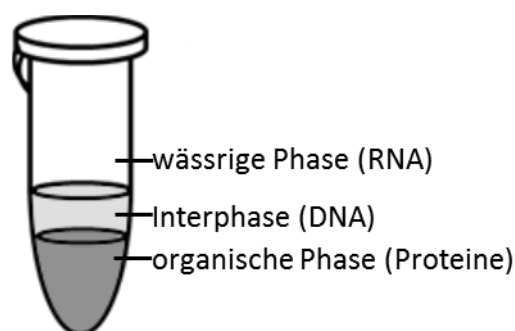


Abbildung 8: Phenol-Chloroform RNA-Extraktion

In der obersten Phase befindet sich die RNA, in der Interphase DNA und in der organischen Phase Proteine.

Die oberste Phase wurde langsam abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Eine exakte Phasentrennung ist entscheidend für die Reinheit der isolierten RNA. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde erneut zentrifugiert und die oberste Phase abgenommen. Dann wurden 200 µl Ethanol dazugegeben. Zur Fällung der RNA wurden die Proben für 2 Stunden bei -80° C eingefroren. Es folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 15.000 g und 4° C. Am Boden des Gefäßes bildete die RNA ein Pellet. Durch Abkippen und behutsames Pipettieren wurde der Überstand entfernt. Um keine Ethanolreste im Pellet zu behalten, wurden die Röhrchen für 1 bis 3 Stunden mit offenem Verschluss zum Trocknen unter einen sterilen Abzug gestellt. Abschließend wurde die RNA mit 10 bis 200 µl Wasser resuspendiert, abhängig von der vermuteten Menge an RNA in der Probe.

Die Konzentration von RNA in einer Lösung wurde über die optisch Dichte (OD) bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt (siehe Abbildung 9). Sie wurde errechnet durch die OD, die Verdünnung und einen für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Das OD_{260}/OD_{280} Verhältnis dient zur Beurteilung der RNA-Reinheit. Proteinfreie Nukleinsäure-Lösungen weisen Verhältnisse von 1,8 bis 2,0 auf. Durch Unterschiede in Salzgehalt oder pH kann es jedoch zu deutlichen Schwankungen in der Messung kommen. Als optimal gilt ein pH Wert von 8,0 bis 8,5 (Wilfinger *et al* 1997).

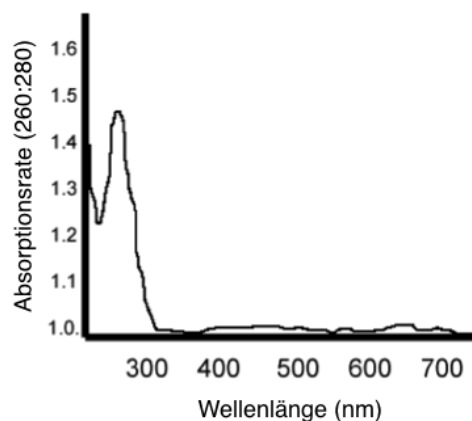


Abbildung 9: Photometrische Messung von RNA

RNA wurde aus HEK-293-Zellen isoliert. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde im Nanodrop der Fa. Implen photometrisch gemessen. Aufgetragen ist das Verhältnis zwischen der Absorption von Licht bei 260 und 280 nm in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei der die optische Dichte gemessen wurde.

2.5.6 Reverse Transkription

Die Reverse-Transkriptions-Polymerase-*chain*-Reaktion (RT-PCR) erlaubt es quantitative Aussagen über die mRNA-Expression bestimmter Gene zu treffen. Um die RNA in die RT-PCR einsetzen zu können, muss sie zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Dafür nutzt man als Enzym eine Reverse Transkriptase und verwendet entweder *oligo*(dT)18-Primer, die komplementär zum 3'-*poly*(A)-Ende von mRNA sind, genspezifische Primer oder ein Gemisch aus sogenannten *Random*-Primern, die aus Nukleotidhexameren variabler Sequenz bestehen.

Als Enzym diente im vorliegenden Projekt MulV, ein Fusionsprotein mit Anteilen aus einem Bakterium und einem murinen Leukämie-Virus. Die reverse Transkription läuft in zwei Schritten ab. Zunächst erfolgt die Hybridisierung, gefolgt von der eigentlichen reversen Transkription. Für das *Annealing* wurden folgende Reagenzien in einem 20 µl Ansatz zusammengemischt und in einem Thermocycler für 3 Minuten bei 70° C inkubiert: 2 µl *Random*-Primer, 4 µl dNTPs, 5 µl RNA und 5 µl H₂O. Vor Beginn der reversen Transkription wurde das Enzym hinzugefügt: 4 µl MulV Puffer, 1 µl MulV und 0,5 Ribolock RNase-Inhibitor. Nach einer Inkubation bei 37° C für 1 Stunde wurde das Enzym für 10 Minuten bei 70° C inaktiviert. Abschließend wurden die Proben auf 4° C abgekühlt und die RNA mit der Phenol-Chloroform-Methode aufgereinigt.

2.5.7 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Durch die Reverse-Transkriptions-Polymerase-*chain*-Reaktion kann aus RNA umgeschriebene cDNA quantifiziert werden. Die DNA-Amplifikation der PCR spiegelt sich in der Zunahme an Fluoreszenz wieder: Dem herkömmlichen Ansatz einer PCR mit spezifischen Primern, zu amplifizierender DNA und einer Hitze-stabilen Polymerase, wird eine Fluoreszenz-markierte Sonde in Form eines spezifischen DNA-Oligonukleotids hinzugefügt. Die Sonde bindet komplementär die zu amplifizierende DNA. Diese Sonden tragen einen sogenannten *quencher*, der initial einen ebenfalls in der Sonde enthaltenen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am Freiwerden hindert.

Die in der RT-PCR verwendete Polymerase hat zusätzlich die Aktivität einer 5'-3'-Exonuklease. Während der Synthese des Gegenstranges baut die Polymerase die Sonde ab. Dabei werden der *quencher*, der bis dahin das Fluoreszenzsignal unterdrückt hat, und der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff voneinander getrennt. Dies führt zu einem proportional zur Menge der Amplifikate ansteigenden und damit messbaren Fluoreszenzsignal. Die Fluoreszenz überschreitet die Hintergrund-Fluoreszenz der Platte umso früher, je mehr Ausgangs-DNA sich in dem Ansatz befunden hat.

Die Zunahme der Fluoreszenz einer Reaktion wird in Echtzeit gemessen und lässt sich über die Zeit auftragen. Das Ergebnis ist eine sigmoidale Sättigungskurve. Aus dieser Kurve errechnet sich der *crossing point* (CP), als der Zeitpunkt bei dem die Fluoreszenz die größte Zunahme der Steigung erfährt. Dies entspricht dem Maximum der zweiten Ableitung und wird als Indikator für das Überschreiten der Hintergrund-Fluoreszenz genutzt. Geringere Mengen DNA führen zu einem verzögerten Anstieg der Fluoreszenz und damit zu höheren CP-Werten. Im vorliegenden Projekt wurde der Kehrwert des CP-Wertes als Maß für die Menge an cDNA in der Probe verwendet, was jedoch den exponentiellen Zusammenhang zwischen Ausgangs- und Endmenge, sowie die Primer-spezifische Effektivität der PCR ignoriert.

Liegt der komplette RNA-Pool einer Zelle vor und richtet man den Ansatz der RT-PCR über jeweils spezifische Primer auf verschiedene Gene aus, lässt sich eine Aussage über die relative Häufigkeit einer DNA bzw. der ursprünglichen RNA treffen. Die sogenannten *House-keeping*-Gene, die nicht vom experimentellen Vorgehen beeinflusst und relativ stabil exprimiert werden, können dann als Referenz dienen. Zu diesen zählt zum Beispiel die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Durch diese Referenz kann eine relative Quantifizierung erzielt werden. Im vorliegenden Experiment wurde jedoch meist auf diese Referenz verzichtet, da nicht mit Gesamt-RNA, sondern mit der RNA aus Koimmunpräzipitat gearbeitet wurde. Dort war erwartungsgemäß nur eine sehr geringe Menge HPRT nachweisbar.

Mit Hilfe der RT-PCR kann RNA bzw. cDNA prinzipiell auch absolut quantifiziert werden. Dazu setzt man eine bekannte Menge RNA in Transkription und RT-PCR als Standard ein und verwendet dabei dieselben Primer wie in der experimentellen Bedingung, sodass das Umschreiben und Amplifizieren beider Proben mit gleicher Effektivität abläuft. Dieses Vorgehen kann genutzt werden, um die Qualität einer RNA-Koimmunpräzipitation zu beurteilen. In der vorliegenden Arbeit stand auf Grund der offenen Fragestellung keine definierte RNA zur Verfügung. Eine absolute Quantifizierung war also nicht möglich.

Die Primer für die RT-PCR wurden mit Hilfe eines von der Fa. Roche im Internet zur Verfügung gestellten Programms (www.universalprobelibrary.com) entworfen, mit einer geeigneten Probe aus der *Universal Probe Library* kombiniert und über die Fa. Metabion (Planegg/Steinkirchen) erworben. Ein RT-PCR Ansatz bestand aus 10 µl Roche-Enzym-Mix, 2,2 µl H₂O, 0,4 µl je Primer, 0,2 µl Sonde und 6 µl cDNA.

2.5.8 Deep sequencing

Als *deep sequencing* (auch *next-generation-sequencing*) bezeichnet man die zeitlich parallel verlaufende Sequenzierung mehrerer DNA-Proben in großem Maßstab. Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist, dass die Sequenzen und deren quantitative Zusammensetzung vor der Sequenzierung nicht bekannt sein müssen. Liu *et al.* fassten 2012 die Methoden des *deep sequencing* in einer Übersichtsarbeit zusammen, so auch das im vorliegende Projekt angewendete 454 System der Fa. Roche (Liu *et al.* 2012). Mit bis zu 700 Basenpaaren gegenüber 100 Basenpaaren ist die Länge der sequenzierten Sequenzen bei der 454 Sequenzierung im Vergleich zur Illumina-Plattform länger. Das 454 System beruht auf der Pyrosequenzierung. Die DNA wird in einzelne Stränge denaturiert und über Adapter mit *beads* verbunden. Pro Zyklus wird eines der vier dNTPs zur DNA gegeben. Bei der Paarung der komplementären Nukleotide entsteht nach Freisetzung von Pyrophosphat detektierbares Licht. Die nicht gepaarten Basen werden degradiert. Dann wird die Reaktion mit einem anderen dNTP wiederholt. Nach Zuordnung von Lichtreaktion und jeweiligem dNTP kann die Sequenz der DNA ermittelt werden.

Zur Identifikation der an RIG-I gebundenen RNAs mittels *deep sequencing* wurde die koimmunpräzipitierte bzw. Gesamt-RNA wie oben beschrieben isoliert. Die weitere Vorbereitung der Proben auf das *deep sequencing* erfolgte in Zusammenarbeit mit der Fa. Vertis Biotechnologie AG (Freising, DE) und wird im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben (siehe Kapitel 3.3.1).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Protokolls zur Isolation RIG-I-gebundener viraler RNA

Ziel der Arbeit war es die viralen RNAs zu identifizieren, die RIG-I im Rahmen einer VSV-Infektion aktivieren. Dazu wurde systematisch ein Protokoll zur Isolierung von RNA etabliert, die zusammen mit RIG-I koimmunpräzipitiert werden kann.

3.1.1 Die VSV-Infektion transient RIG-I/FLAG-exprimierender HEK-Zellen eignet sich nicht zur Isolation von RNA-Liganden

Prinzipiell ist zur Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung auch die Verwendung von HEK-293-Zellen, die transient RIG-I/FLAG-exprimieren, möglich und wurde zunächst getestet. Das dabei verwendete Lipofektamin beeinträchtigte jedoch in den durchgeführten Experimenten die Zellvitalität und nur maximal 40 % der Zellen exprimierten RIG-I/FLAG nach Transfektion (Daten nicht gezeigt).

Das Zellsystem der stabil und induzierbar RIG-I/FLAG-exprimierenden Flp-In-T-Rex-Zelllinie benötigt kein Lipofektamin und die Zellen leben länger. Nahezu alle Zellen exprimieren nach Induktion RIG-I/FLAG. Insgesamt steht eine größere Ausgangsmenge an Zelllysatz zur Verfügung und der Ertrag des experimentellen Ansatzes wurde durch die Verwendung der stabil und induzierbar RIG-I-exprimierenden Zelllinie deutlich gesteigert (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Die vollständige Lyse der Zellen und RNase-freie Bedingungen sind entscheidend für die Aufreinigung von RIG-I-Liganden

Die Qualität der Isolation von RNA-Liganden von RIG-I hängt von der vollständigen Lyse der Zellen und der Konservierung der RNA während der weiteren Prozessierung ab.

Der für die Lyse verwendete Puffer wurde von einem Kooperationspartner für die Verwendung im Rahmen einer Koimmunpräzipitation entwickelt (Meister *et al.* 2005). Vor der Lyse der virusinfizierten Zellen wurde das Inoculum entfernt und die Zellen in neuen Puffer übertragen. Beim Ablösen adhärenter Zellen wurde zunächst ein Zellschaber verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente blieben hinsichtlich der Ausbeute an RNA jedoch unter den Erwartungen (siehe Kapitel 3.2.2). Eine mögliche Erklärung lag in der mechanischen Beeinträchtigung der Zellen durch den Zellschaber. Durch den Kontakt der zytoplasmatischen RNA mit dem Zellmedium und den darin enthaltenen RNAsen war der Abbau der RNA möglich. Daher wurden die Zellen im weiteren Verlauf des Projekts durch bloßes Abklopfen vom Boden der Zellkultur-Flasche gelöst. Das Medium mit den frei diffundierenden Zellen wurde zentrifugiert, das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde diese Resuspension nur mit der Pipette durchgeführt. Da sich anschließend in der mikroskopischen Kontrolle noch intakte Zellen zeigten, wurde die Zelllyse später mechanisch durch mehrfaches Aufziehen und Ausdrücken des Lysats in einer sterilen 5 ml-Spritze mit 18 G-Kanüle unterstützt. So konnte eine vollständige Lyse erzielt werden.

Um eine Kontamination der Proben mit RNAsen zu verhindern, wurde ein spezieller, RNase-freier Arbeitsplatz eingerichtet. Alle verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen und Reagenzbehälter waren zertifiziert RNase-frei. Die Pipettenspitzen waren mit entsprechenden Filtern ausgestattet. Die Pufferlösungen beinhalten RNase-Inhibitoren. Der Lysepuffer wurde bei -20° C gelagert, das Zelllysats während der Experimente auf Eis gestellt. Die Co-IP erfolgte im Kühlraum bei 4°C. Durch diese Optimierungen des experimentellen Protokolls konnte die Ausbeute an RNA deutlich gesteigert werden.

3.1.3 Mit der Phenol-Chloroform-Methode kann RNA aus RIG-I/FLAG-Komplexen isoliert werden

Die initiale Erwartung war gewesen, dass die Lösung der viralen RNA aus der Bindung an RIG-I die Verwendung von Proteinase K nötig machen würde. Im Verlauf der Experimente stellte sich jedoch heraus, dass eine Kontamination von Proteinase K mit RNAsen zu einem hohen Verlust von RNA führte. Im optimierten Protokoll wurde daher die RNA direkt aus dem Eluat der Immunpräzipitation isoliert und auf die Proteinase K verzichtet. Während die resultierende RNA bei Verwendung des kommerziellen TRIZOL-Reagenz zur RNA-Isolation von mangelhafter Reinheit und Menge war, konnte unter Verwendung von saurem Phenol-Chloroform eine gesteigerte Reinheit und Ausbeute erzielt werden.

Phenol dient einerseits als Hilfsmittel um Protein- und Peptidreste aus der Probe zu entfernen. Andererseits kann es für nachfolgende Schritte, die Enzymaktivitäten beinhalten, nachteilig sein. Um möglichst phenolfreie Produkte zu erhalten (Absorptionsrate 260/280 nm > 1,8 und eindeutiges Absorptionsmaximum bei 260 nm), wurde darauf geachtet, keine Bestandteile der unteren beiden Phasen zu transferieren.

Die Verwendung von DNAsen konnte die Reinheit der RNA nicht steigern, was sich auf die relativ spezifische Anreicherung von RNA durch das saure Phenol-Chloroform zurückführen lässt. Zusätzliche Chloroform-Wasch-Schritte reduzierten die Phenol-Reste, führten jedoch zu einem Verlust an RNA. Während der systematischen Optimierung des Protokolls stellte sich heraus, dass eine viermalige Wiederholung des Waschschrtes mit Chloroform ein Optimum an Reinheit und Ausbeute ermöglichte.

Die Verwendung von Isopropanol statt Ethanol zur RNA-Fällung, die Zugabe von Ammonium-Acetat und der Einsatz von Glykogen als Trägersubstanz für die RNA (auf Vorschlag von Jan Rehwinkel, damals *Cancer Research UK* in London) steigerten die Ausbeute weiter (Daten nicht gezeigt).

3.2 Die maximale Menge VSV-RNA ist nach neun Stunden Infektion nachzuweisen

Um den Zeitpunkt des Auftretens der größten Menge an viraler RNA in der Zelle zu bestimmen, wurden transient RIG-I-exprimierende HEK-293-Zellen mit VSV in drei unterschiedlichen Konzentrationen infiziert. Jeweils zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde aus den Zellen RNA extrahiert und mittels RT-PCR wurden die viralen Gene M, NS und G nachgewiesen (siehe Abbildung 10).

In der Bedingung „Viruskonzentration 1 MOI und 9 h Infektion“ war die Konzentration der viralen Gene am höchsten. Die Bedingung, in der die Infektion bei einer MOI von 1 während einer Dauer von zwölf Stunden ablief, zeigte keine weitere Steigerung der Konzentrationen viraler RNA.

Dieses Resultat wurde in den nachfolgenden Experimenten als Grundlage verwendet und die Infektionszeit für Co-IP Experimente auf neun Stunden festgesetzt.

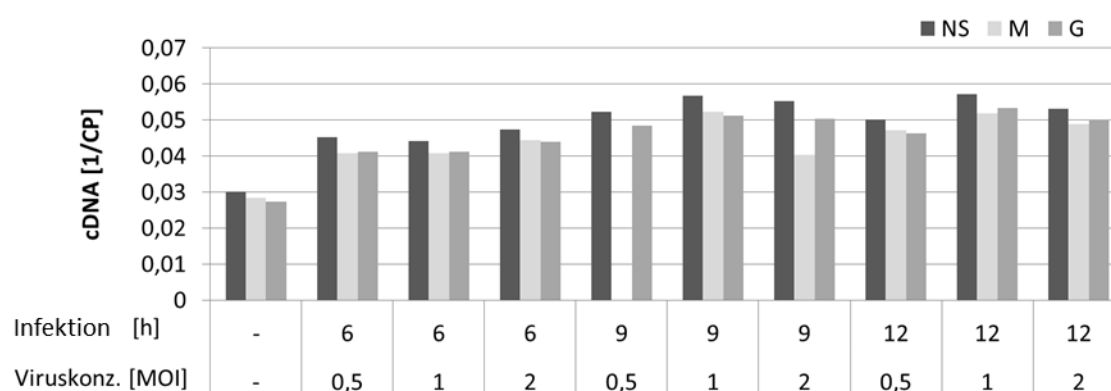


Abbildung 10: Zeitliche Analyse der VSV-Infektion in HEK-293-Zellen mittels RT-PCR

Transient RIG-I-exprimierende HEK-293-Zellen wurden mit VSV in Konzentrationen von 0,5, 1 und 2 MOI infiziert. Nach 6, 9 und 12 Stunden wurde aus den Zellen mittels der Phenol-Chloroform-Methode RNA extrahiert. Dargestellt ist die in der RT-PCR nachweisbare Menge an cDNA (in der Einheit 1/CP) der VSV-Gene M, NS und G.

3.2.1 RIG-I/FLAG lässt sich aus Lysat VSV-infizierter Zellen immunpräzipitieren

Während der Koimmunpräzipitation RIG-I-gebundener RNA wurden die Expression und die eigentliche Immunpräzipitation von RIG-I/FLAG im Western Blot gegen FLAG kontrolliert (siehe Abbildung 11). Den Unterschied zwischen der experimentellen Bedingung und den Kontrollen bildeten Tetrazyklin-Induktion und Virusinfektion. Wie bereits ausgeführt, bietet die etablierte Flp-In-T-Rex-Zelllinie den Vorteil nach Induktion mit Tetrazyklin RIG-I/FLAG zu exprimieren.

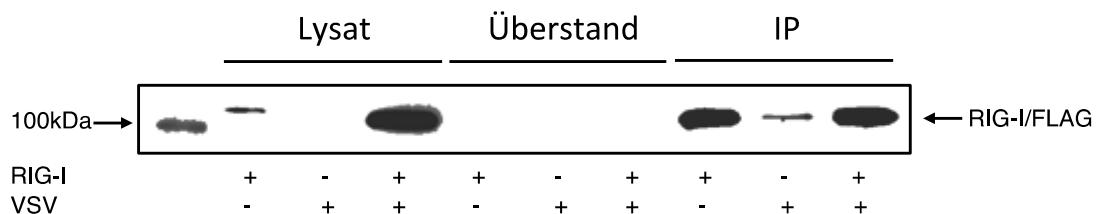


Abbildung 11: Western Blot der Immunpräzipitation von RIG-I/FLAG

Pro Bedingung wurden 3×10^7 HEK-Flp-In-RIG-I/FLAG-Zellen ausplattiert und durch Zugabe von Tetrazyklin wurde in zwei Bedingungen („RIG-I +“) am folgenden Tag die Expression von RIG-I/FLAG induziert. Am dritten Tag wurde in zwei Bedingungen die VSV-Infektion mit 1 MOI durchgeführt („VSV +“). 9 Stunden später wurden alle Zellen lysiert. Nach Immunpräzipitation von RIG-I mittels des Anti-FLAG Antikörpers, wurde die Menge von RIG-I in den einzelnen Schritten der Aufreinigung („Lysat“, „Überstand“, „IP“) im Western Blot mit einem Antikörper gegen FLAG nachgewiesen.

Der Western Blot zeigt die drei Abschnitte des Experiments für die drei Bedingungen der Immunpräzipitation („RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“, „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“, „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“). Am Ergebnis des Western Blot lässt sich ablesen, dass sich RIG-I/FLAG vor der Co-IP nur im Lysat Tetrazyklin-induzierter Zellen nachweisen lässt. Das Auftragen eines Teils des Überstands aus der Co-IP zeigt, dass sich das Lysat mit dieser Methode vollständig von RIG-I/FLAG depletieren lässt, was den Erfolg der Co-IP bestätigt.

Die unterschiedliche Menge von RIG-I/FLAG zwischen Virus-infiziertem und nicht-infiziertem Lysat kann im Eluat nicht bestätigt werden. In der nicht induzierten („VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“) Bedingung lässt sich im Eluat eine diskrete Bande auf Höhe von RIG-I/FLAG ausmachen. Dies spricht dafür, dass auch ohne Induktion eine minimale, basale Expression in den Flp-In-T-Rex-Zellen vorhanden ist, die sich jedoch erst nach Anreicherung mittels Co-IP nachweisen lässt. Zusammenfassend zeigt dieser Western Blot eine erfolgreiche Immunpräzipitation von RIG-I/FLAG und bildete die Grundlage für die Koimmunpräzipitation RIG-I-gebundener RNA.

3.2.2 Im RIG-I/FLAG-Koimmunpräzipitat ist VSV-RNA nachweisbar

Um die Methode der Rückisolation von an RIG-I gebundener RNA zu etablieren, wurde bei der Koimmunpräzipitation zunächst mit synthetischer 5'-Triphosphat-RNA gearbeitet: 200 µg *in-vitro*-transkribierte RNA wurde in RIG-I/FLAG-exprimierende Zellen transfiziert. Nach Co-IP konnten 4×10^{-2} ng der IVT-RNA aus dem Eluat reisoliert werden (Daten nicht gezeigt). Diese relativ niedrige Ausbeute wurde dann durch die Optimierung des Protokolls, insbesondere der RNA-Isolation, deutlich gesteigert (siehe Kapitel 3.1.2). Später wurde die Transfektion mit Triphosphat RNA durch die Infektion mit VSV ersetzt, um in der Lage zu sein den viralen RIG-I-Liganden finden zu können.

Dazu wurden, wie oben beschrieben (siehe 3.2.1), drei Bedingungen der Co-IP definiert. Die aus dem Eluat gewonnene RNA wurde mit der RT-PCR untersucht. Als weitere Bedingung der RT-PCR wurde Gesamt-RNA von für neun Stunden mit VSV-infizierten Zellen genutzt. In Abbildung 12 zeigt die letztgenannte Gesamt-RNA den in der Literatur beschriebenen Gradienten zwischen NS-, M-, G- und L-RNA. In der mit RIG-I koimmunpräzipitierten RNA konnte für das G- und L-Gen eine Anreicherung über die Hintergrundwerte der Kontrollbedingungen beobachtet werden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass virale RNA RIG-I-spezifisch angereichert werden kann. Zudem enthält der RIG-I-Ligand möglicherweise Teile der G- und L- Sequenz von VSV.

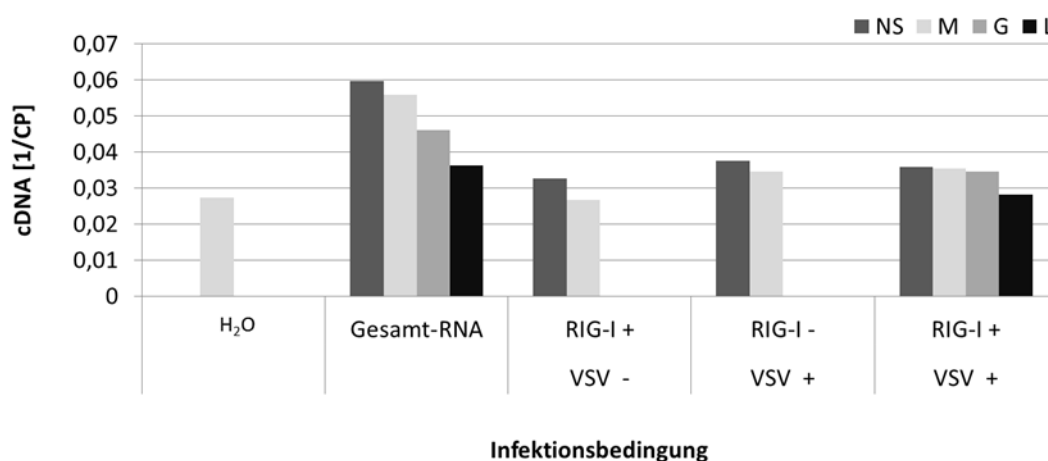


Abbildung 12: RT-PCR-Ergebnisse nach RNA-Koimmunpräzipitation von RIG-I/FLAG

Pro Bedingung wurden 3×10^7 HEK-Flp-In-RIG-I/FLAG-Zellen ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde die Expression von RIG-I/FLAG durch Tetrazyklin („RIG-I +“) induziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit VSV (MOI = 1) infiziert („VSV +“). Die Zellen wurden 9 Stunden nach Infektion lysiert und mittels Anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitiert. Als Negativkontrollen wurden Lysate von nicht-infizierten (RIG-I +, VSV -) oder nicht induzierten Zellen (RIG-I -, VSV -) immunpräzipitiert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Umschrieb mit *Random*-Primer wurden mittels RT-PCR die Kopien der viralen Gene NS, M, G und L gemessen. Als Negativkontrolle für unspezifische Amplifikate wurde Wasser („H₂O“) in die RT-PCR eingesetzt. Gesamt-RNA aus für 9 Stunden VSV-infizierten HEK 293 Zellen („Gesamt-RNA“) diente als Positivkontrolle. Als Maß für die Menge der spezifischen cDNA einer Probe wurde der Kehrwert des jeweiligen CP-Werts gebildet. Die hier dargestellten Daten sind repräsentativ für drei Experimente.

3.3 Deep sequencing RIG-I-gebundener RNA

Nach der erfolgreichen Reisolation von RIG-I/FLAG-gebundener RNA sollte die RNA mit einer Methode sequenziert werden, die es erlaubt möglichst alle in Frage kommenden RNA-Liganden von RIG-I zu detektieren, ohne deren Eigenschaften zu kennen. Das *deep sequencing* ist diesbezüglich dem klassischen Sequenzieren nach Sanger überlegen, da beim *deep sequencing* die Nukleinsäuren eines Nukleinsäure-Gemischs unbekannter Zusammensetzung zunächst vereinzelt werden und dann diese vereinzelt Nukleinsäuren in großer Zahl parallel sequenziert werden.

Vor der Sequenzierung wurde die RNA aus der Co-IP zunächst hinsichtlich ihrer Konzentration analysiert, in cDNA transkribiert und dann die relevanten Größenfraktionen nach Elektrophorese-Auftrennung reisoliert. Neben der experimentellen Bedingung und den beiden Kontrollbedingungen wurde auch Gesamt-RNA aus VSV-infizierten Zellen analysiert.

3.3.1 RNA-Analyse, cDNA-Synthese und Gel-Fraktionierung bereiten das *deep sequencing* vor

Die Vorbereitung der Co-IP-Proben und das *deep sequencing* wurden in Kooperation mit der Fa. Vertis Biotechnologie AG (Freising, DE) durchgeführt. Vor der Sequenzierung wurde die RNA per Shimadzu-MultiNA-microchip-Elektrophorese analysiert.

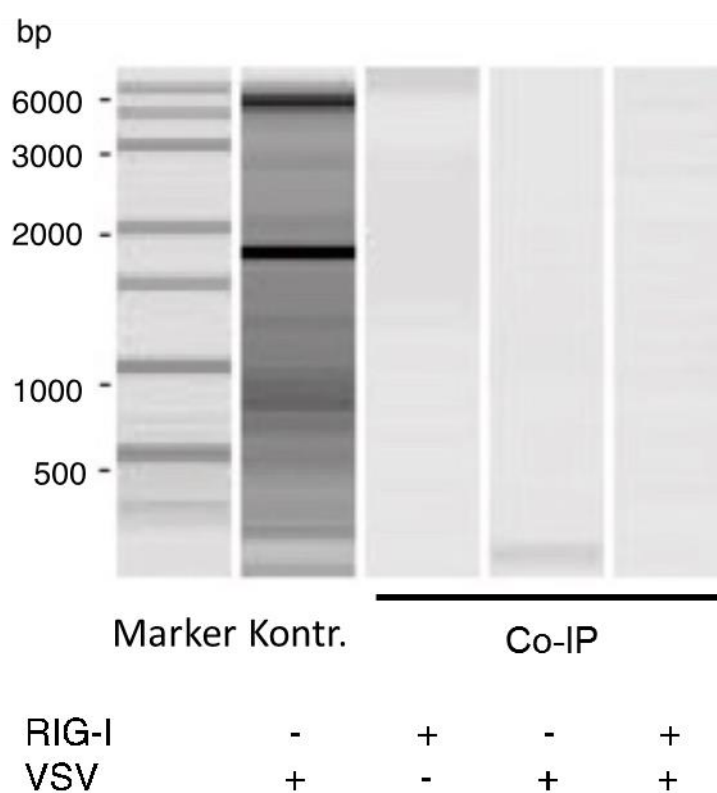


Abbildung 13: RNA-Gel von Gesamt-RNA und den drei Co-IP-Bedingungen

Die Gesamt-RNA, sowie die RNA aus den einzelnen Bedingungen der Co-IP wurden mittels Shimadzu-MultiNA-microchip-Elektrophorese analysiert. In der ersten Laufbande nach dem Marker ist die Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen aufgetragen. Sie wird hier als Kontrollbedingung („Kontr.“) bezeichnet. Es folgt die RNA der Co-IP-Bedingungen. „RIG-I +“ bedeutet, dass die Zellen Tetrazyklin-induziert wurden. „VSV +“ zeigt an, dass die Zellen mit VSV in einer MOI von 1 für 9 Stunden infiziert wurden.

Es zeigte sich besonders in den Proben aus der Co-IP eine sehr geringe Menge RNA (siehe Abbildung 13). Auf dem RNA-Gel entsprechen die beiden kräftigen Banden in der Gesamt-RNA der ribosomalen 18S- und 28S-RNA mit 1874 bzw. 4718 Nukleotiden, die sich, wie erwartet, in den Proben nach Co-IP nicht mehr nachweisen lassen. Die RNA der Co-IP-Bedingungen und die Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen wurden anschließend unterschiedlich verarbeitet.

Die RNA der Co-IP-Bedingungen wurde mittels *poly(A)*-Polymerase an ihrem 3'-Ende um einen *poly(A)*-Schwanz verlängert, um die Synthese der cDNA mittels *oligo(dT)*-Adapter-Primer und der M-MLV Reversen-Transkriptase zu ermöglichen. Dann wurden spezifische Adapter an das 5'- und 3'-Ende der noch einzelsträngigen cDNA ligiert.

Die resultierende cDNA war doppelsträngig und trug den folgenden Aufbau (Beschreibung kursiv in Klammern hinter der jeweiligen Sequenz):

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (*454 Adapter A1*) - NNNNNN
 (*tag*) GACCTTGGCTGTCACTCA (*5'-Adapter*) - NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNNN (*cDNA 100 bis 500 Basenpaare*) - TCGCAGTGAGT
 GACAGGCCA (*3'-Adapter*) - CTGAGACTGCCAAGGCACACAGGGGATAGG
 (*3'-454 Adapter B1*)

Die cDNA der Co-IP-Bedingungen hatte inklusive der Adapter für PCR und *deep sequencing* eine Größe von circa 200 bis 500 Basenpaaren. Die cDNAs der Co-IP-Bedingungen wurden in einer PCR gemäß den Vorgaben der Fa. Roche für die 454-Sequenzierung mit Primern vervielfältigt, die komplementär zu den hinzugefügten Adapter-Sequenzen sind.

Für die Bedingungen „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ und „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ wurden je 28 und für die Bedingung „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ 35 PCR-Zyklen durchgeführt.

Das Resultat der PCR wurde in einer Elektrophorese kontrolliert (siehe Abbildung 14). Unter 50 und über 500 Basenpaaren sind keine eindeutigen DNA-Banden zu identifizieren. In den drei Bedingungen der Co-IP liegen je zwei prominente Banden unterschiedlicher Stärke im Bereich um 100 Basenpaare. Darüber hinaus zeigt sich in den Co-IP-Bedingungen mit zunehmender Länge an Basenpaaren ein Abfall der Häufigkeit.

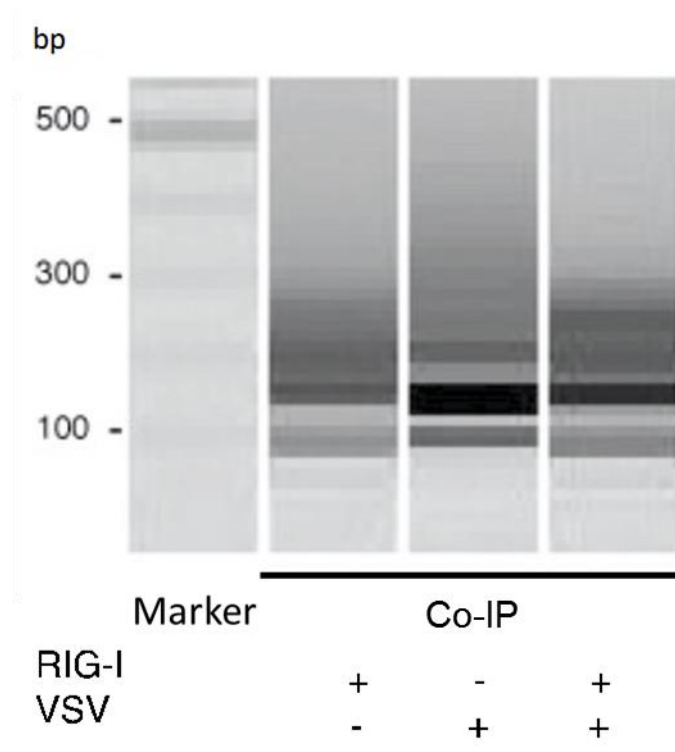


Abbildung 14: cDNA-Gel der drei Co-IP-Bedingungen nach Amplifikation

Aus der in Abbildung 13 analysierten RNA wurde cDNA erstellt und mittels PCR amplifiziert. Die cDNA der Co-IP-Bedingungen wurde mittels Shimadzu-MultiNA-microchip-Elektrophorese analysiert. Abgebildet sind die Laufbanden der drei Bedingungen der Co-IP. Zuerst der Marker, dann die Kontrollbedingungen „RIG-I-FLAG-induziert und keine Infektion“ und „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“, dann die experimentelle Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“. Die im Vergleich zu konventionellen Gelen ungewohnte Schärfe der Banden beruht auf der primär digitalen Ausgabe der Chip-Elektrophorese.

Aus der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen wurde die mRNA (mit *poly(A)*-Schwanz) isoliert und per *Random*-Hexamer Primer in cDNA umgeschrieben. Dann wurden spezifische Adapter an die 5'- und 3'-Enden ligiert. Die cDNA wurde anschließend in 19 PCR Zyklen amplifiziert und das Ergebnis in der Chip-Elektrophorese kontrolliert (siehe Abbildung 15): Zwischen der 500 und 600 Basenpaar-Marke zeigt sich ein Maximum, das nach oben und unten im Bereich von 800 bzw. 300 Basenpaaren ausläuft.

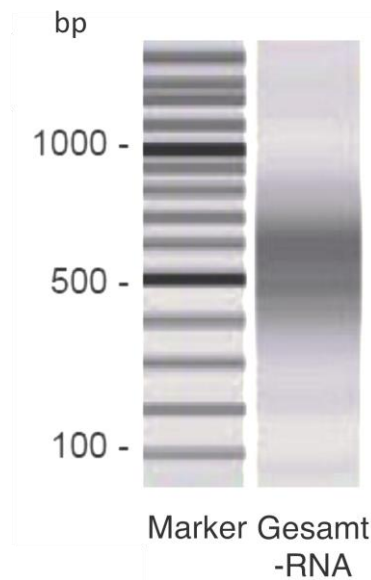


Abbildung 15: cDNA Gel der Gesamt-RNA

Die in Abbildung 13 analysierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert. Die amplifizierte cDNA wurde der Shimadzu-MultiNA-microchip-Elektrophorese unterzogen. Neben der Markerbande, mit 100 Basenpaaren (bp) Abständen, läuft der cDNA-Umschrieb der Gesamt-RNA VSV-infizierter HEK-Zellen.

Nach der Chip-Elektrophorese wurde die cDNA der Größe zwischen 200 und 500 Basenpaaren (Co-IP-Bedingungen) bzw. 500 bis 700 Basenpaaren (Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen) reeluiert und zu einem 25 µl Volumen mit einer cDNA Konzentration von 13 ng/µl vereint. Ein Teil dieser größenfraktionierten cDNA wurde per Kapillarelektrophorese analysiert (siehe Abbildung 16): Im Bereich um 250 Basenpaaren zeigt sich ein Maximum, das etwa bis 400 bzw. 200 Basenpaaren ausläuft. Bei 150 Basenpaaren kann eine zusätzliche Bande abgegrenzt werden, die sich am ehesten durch cDNA-Degradation erklären lässt. Nach dieser Vorbereitung erfolgt das *deep sequencing*.

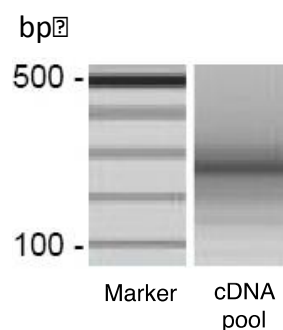


Abbildung 16: Analyse des Größen-fraktionierten cDNA-Pools aus Co-IP und Gesamt-RNA

Die cDNA der Co-IP-Bedingungen und der Gesamt-RNA wurde gepoolt und wurde per Shimadzu MultiNA Microchip Elektrophorese analysiert.

3.3.2 RIG-I-assoziierte RNA kann mittels deep sequencing analysiert werden

Das *deep sequencing* wurde mittels der GS FLX Titanium Plattform durchgeführt, die auf dem Prinzip der 454-Sequenzierung beruht. In der Sequenzierung ergaben sich 25.047 bis 64.939 Sequenzen einer durchschnittlichen Länge zwischen 52,59 und 240,55 Basen (siehe Tabelle 1). Die Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ hat die geringste Anzahl an Sequenzen, die Bedingung „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ zeigt die höchste Anzahl an Sequenzen. Die durchschnittliche Länge der Sequenzen ist maximal in der Gesamt-RNA und minimal in der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“.

Tabelle 1: Eigenschaften der cDNA nach dem *deep sequencing*

| Bedingung | Gesamt-RNA VSV + | RIG-I + VSV - | RIG-I - VSV + | RIG-I + VSV + |
|-------------------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|
| Barcode | ACGTGC | AGCGTA | AGTCAG | ATACTG |
| Anzahl Sequenzen | 26.821 | 25.047 | 64.939 | 32.987 |
| Ø Länge Sequenzen | 240,55 | 66,78 | 82,11 | 52,59 |
| Anzahl sequenzierter Basen | 6.451.830 | 1.672.589 | 5.332.256 | 2.783.320 |

Aus den in Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Erstellung der cDNA-Bibliothek erfolgreich war. Die Zuordnung der einzelnen Sequenzen zu ihren Bedingungen ist anhand der Barcode-Sequenzen möglich. Für jede Bedingung der Co-IP und auch die Gesamt-RNA konnten im vergleichbaren Maßstab Sequenzen generiert werden. Um einen Eindruck von der Größenverteilung der cDNA-Sequenzen zu erlangen, wurde diese mit der Software *Genomics Workbench* der Fa. CLC geblottet.

Trennt man die Anzahl der Sequenzen der cDNA für die einzelnen Bedingungen des *deep sequencings* der Länge nach auf, zeigt die cDNA der Gesamt-RNA eine gleichmäßige Verteilung bis knapp über 500 Nukleotide (siehe Abbildung 17). Um 200 Nukleotide entsteht ein lokales Maximum.

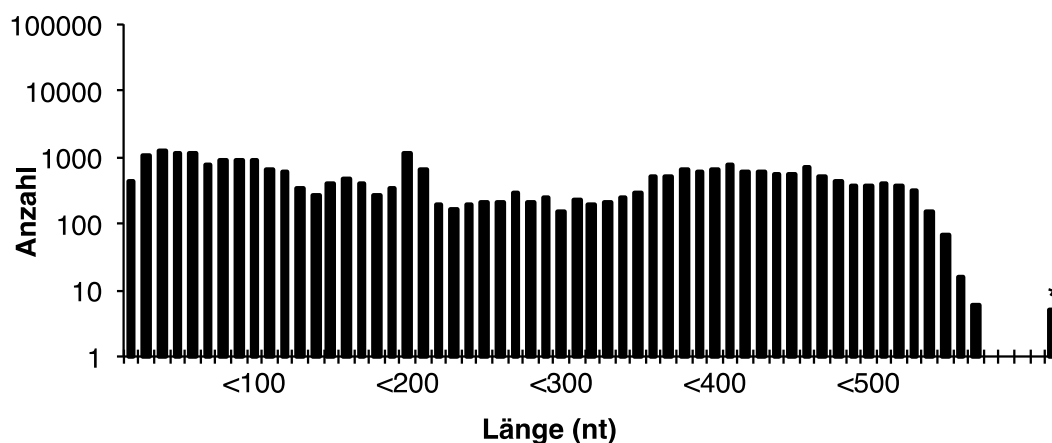


Abbildung 17: Verteilung der cDNA aus der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen im *deep sequencing*
Dieses Histogramm zeigt die Anzahl der Sequenzen einer definierten Nukleotidlänge innerhalb der cDNA aus Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen. Sequenzlängen die in eine Dekade fallen sind jeweils in einem Balken zusammengefasst.

* 5 Sequenzen mit einer Länge über 610 Nukleotiden

Die Sequenzlänge ergibt sich einerseits aus der Länge der ursprünglichen RNA, andererseits aus der Selektion von cDNAs einer bestimmten Länge bei der Probenvorbereitung. Zudem können kürzere Sequenzen durch Degradation der cDNA oder Abbruch der Sequenzierung entstehen. Aus der Probenvorbereitung wäre eine maximale cDNA-Länge unter 500 Basenpaaren (Co-IP-Bedingungen) bzw. 700 Basenpaaren (Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen) zu erwarten.

Die Anzahl der cDNA-Sequenzen in den drei Bedingungen der Co-IP nimmt mit Zunahme der Länge der Sequenzen ab (siehe Abbildung 18). Entsprechend der Angaben im Protokoll der Probenvorbereitung zeigt die cDNA der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen eine Länge unter 700 Nukleotiden. Die cDNA der Co-IP-Bedingungen ist nicht länger als 500 bis 530 Nukleotide. Kleine, lokale Maxima lassen sich allenfalls in den Bedingungen „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ und „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ bei 120 bzw. 120, 170 und 320 Nukleotiden beobachten.

Die Tatsache, dass eine bestimmte, eindeutig angereicherte Sequenzlänge fehlt, lässt sich am ehesten durch einen hohen Anteil unspezifisch gebundener RNA erklären. Dieser Gradient kann aber auch durch eine Degradation der RNA oder cDNA entstanden sein.

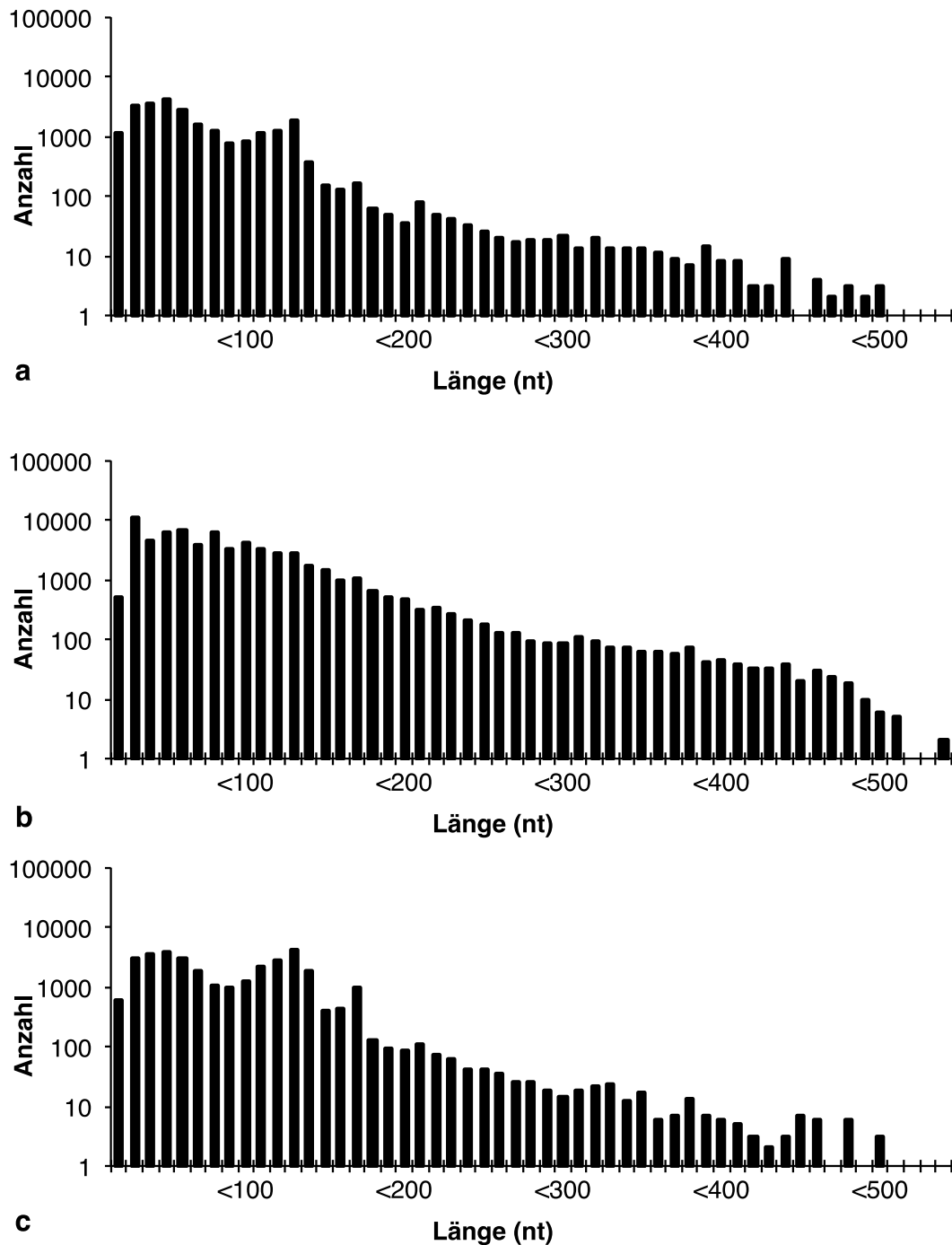


Abbildung 18: Anzahl und Länge der cDNA der Co-IP-Bedingungen im *deep sequencing*

- a) „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“
- b) „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“
- c) „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“

Nach der Sequenzierung erfolgte die Ausrichtung (englisch *alignment*) am Genom des VSV. Hierzu wurde ebenfalls die Software *Genomics Workbench* der Fa. CLC verwendet. Da die cDNA der Proben sequenziert wurde, diente als Referenz die cDNA-Sequenz des VSV-Genoms.

Bei der Analyse konnte in den verschiedenen Bedingungen für 4 bis 49 Sequenzen eine Übereinstimmung mit der cDNA des VSV-Genoms als Referenz erzielt werden (siehe Tabelle 2). Diese Sequenzen waren in der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ mit einer mittleren Länge von etwa 52 Basen deutlich kürzer als in den anderen Bedingungen.

Der Anteil der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen an allen Sequenzen lag zwischen 0,16 ‰ in der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ und 1,49 ‰ in der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“.

Tabelle 2: Übereinstimmung von Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen und RNA der Co-IP gegenüber dem VSV-Genom

| | | Bedingung | Gesamt-RNA | RIG-I + | RIG-I - | RIG-I + | |
|-----------|----------------|-----------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | VSV + | VSV - | VSV + | VSV + | | |
| Sequenzen | mit | Übereinstimmung | Anzahl | 33 | 4 | 22 | 49 |
| | | | Ø Länge (bp) | 375,12 | 241,75 | 196,36 | 52,59 |
| | | | Basenanzahl | 12.379 | 967 | 4.320 | 2.577 |
| | ohne | | Anzahl | 26.788 | 25.043 | 62.917 | 32.938 |
| | | | Ø Länge (bp) | 240,39 | 66,75 | 82,07 | 84,42 |
| | | | Basenanzahl | 6.439.451 | 1.671.622 | 5.327.936 | 2.780.743 |
| | Verhältnis (‰) | | 1,23 | 0,16 | 0,34 | 1,49 | |

Betrachtet man die Analyse der Gesamt-RNA zeigt sich, dass gerade einmal 33 von 26.788 Sequenzen der mRNA, also 1,23 ‰, die in einer VSV-infizierten Zelle nach neun Stunden vorkommen, viralen Ursprungs sind.

Neben der Gesamt-RNA sind die Bedingungen der Co-IP aufgetragen. Der Anteil der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden RNAs ist in der Bedingungen „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ und „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ mit 0,16 und 0,34 ‰ gegenüber der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ mit 1,49 ‰ deutlich geringer.

Erwartungsgemäß lassen sich also in der nicht infizierten Bedingung relativ wenige virale Sequenzen nachweisen. Zudem ist der Nachweis viraler Sequenzen abhängig von der Induktion von RIG-I/FLAG, wie der Vergleich der Virus-infizierten Bedingungen der Co-IP zeigt. Der Faktor der Anreicherung beträgt etwa 2,3. Zusammenfassend konnte im beschriebenen Protokoll RIG-I-assoziierte RNA aus der Co-IP im *deep sequencing* analysiert werden.

3.3.3 In Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen ist die Trailer-RNA nachweisbar

Trägt man alle mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen an der Nukleotidposition ihrer Übereinstimmung auf, so lässt sich aus dem Verteilungsmuster auf den Ursprung der viralen Sequenzen schließen. Die Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen zeigt im Ganzen betrachtet nur eine geringe Abdeckung des als Referenz verwendeten VSV-Genoms. Die Sequenzen mit Übereinstimmung waren meist 350 bis 500 Nukleotide lang. Ihre gesamte Anzahl betrug 33 (siehe Tabelle 2).

Jenseits der Position 11.000 ergibt sich ein deutlicher Gipfel der Abdeckung (siehe Abbildung 19). In diesem Bereich des VSV-Genoms liegt die *Trailer*-Region. Zwei einzelne geringgradig angereicherte Bereiche ergeben sich zwischen Position 1000 und 2500. Diese liegen im Bereich des N- (Position 51 bis 1376) bzw. M-Gens (2209 bis 3039).

Das Ergebnis dieses *alignments* ist insofern unerwartet, als dass man in der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen überwiegend virale mRNAs erwarten würde. Der Verteilungsgradient von N>NS>M>G>L, wie man ihn der RT-PCR-Analyse der Gesamt-RNA gesehen hat (siehe Abbildung 12), kann im *deep sequencing* nicht nachgewiesen werden. Man kann aus diesem Ergebnis schließen, dass die Sensitivität des *deep sequencing* hier nicht besonders hoch ist und eventuell nur die häufigste nach neun Stunden Infektion vorliegende RNA detektiert wurde. Dies scheint die *Trailer*-RNA zu sein.

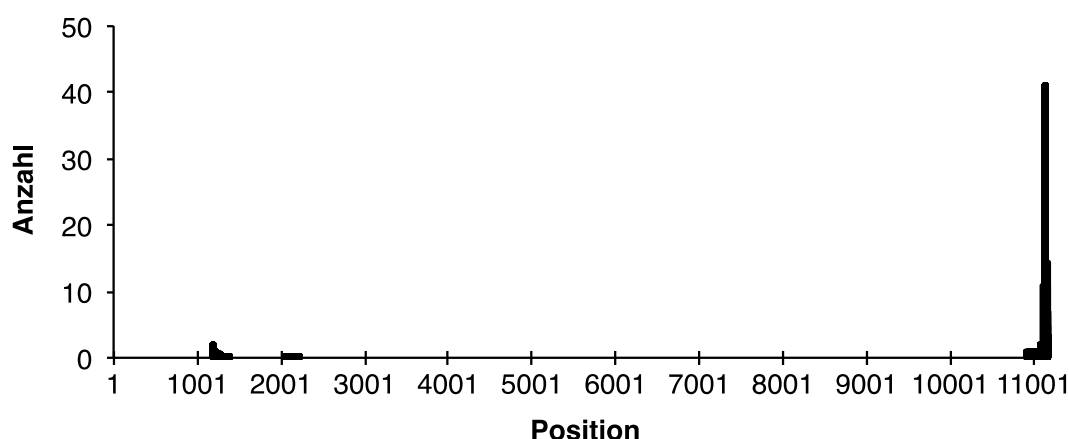


Abbildung 19: Verteilung der übereinstimmenden Sequenzen der Gesamt-RNA aus VSV-infizierten Zellen mit dem VSV-Genom im *deep sequencing*

Die Anzahl der im *deep sequencing* mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen aus der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen wurde an der jeweiligen Position der Übereinstimmung aufgetragen.

3.3.4 Die Trailer-Sequenz der viralen RNA ist Teil des RIG-I-Liganden bei Infektion mit VSV

Nachdem sich in Tabelle 2 andeutet, dass in der RIG-I/FLAG-Co-IP virale RNA angereichert wurde, sollte durch eine graphische Darstellung der Abdeckung der Sequenzen in Bezug auf das VSV-Genom untersucht werden, ob sich aus einem charakteristischen Abdeckungsmuster auf die für diese Anreicherung verantwortliche RNA schließen lässt.

Zunächst soll das Muster der Abdeckung der beiden Negativkontrollen des Experiments näher betrachtet werden. In der Co-IP-Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ konnten nur vier Sequenzen mit Übereinstimmung gefunden werden (siehe Tabelle 2). Diese hatten eine Länge zwischen 200 und 300 Nukleotide. Entsprechend lassen sich auch in der graphischen Darstellung der Abdeckung so gut wie keine Sequenzen mit Übereinstimmung entdecken.

In der Bedingung „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ wurden 22 Übereinstimmungen einer mittleren Länge von unter 200 Nukleotiden identifiziert. Die Verteilung der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen in dieser Bedingung zeigte lokale Maxima in der vorderen Hälfte des VSV-Genoms, die andeutungsweise in Richtung 5'-Ende hin abnehmen. Dieses Muster ist nicht mit einer der beschriebenen RNAs von VSV erklärbar (siehe Abbildungen 20 a und b).

Im Gegensatz zu den Kontrollbedingungen konnte in der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ ein deutliches Maximum der Übereinstimmung jenseits der Position 11.000 identifiziert werden. Zudem zeigen sich lokale Maxima nach den Positionen 1000, 2000 und 3000 die im Gegensatz zur Negativkontrolle ohne RIG-I/FLAG-Induktion keine abnehmende Verteilung in Richtung 5'-Ende aufweisen (siehe Abbildung 20 c). Die übereinstimmenden Sequenzen der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ waren zudem bei einer mittleren Länge von 52 Nukleotiden die kürzesten (siehe Abbildung 21).

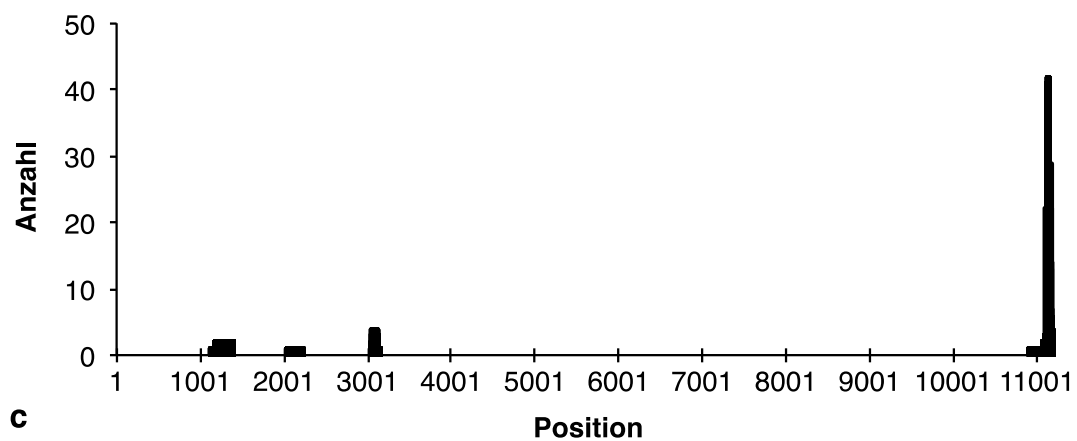
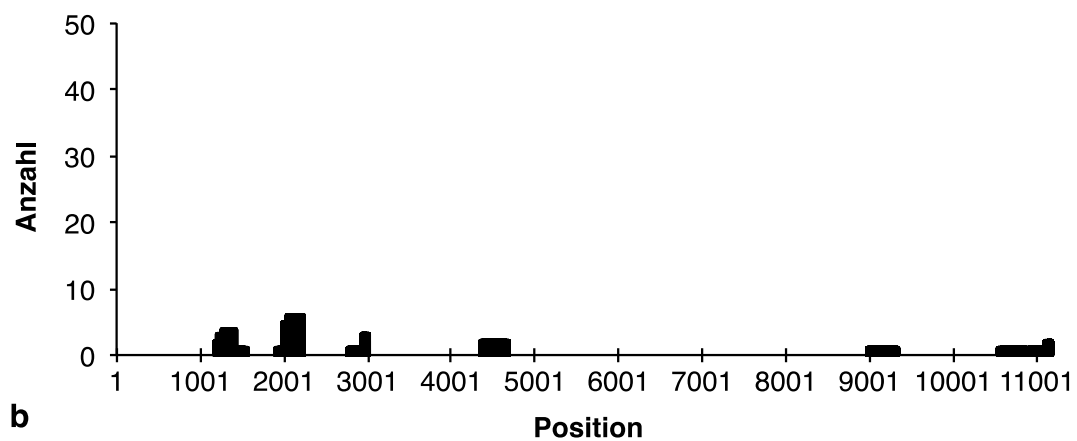
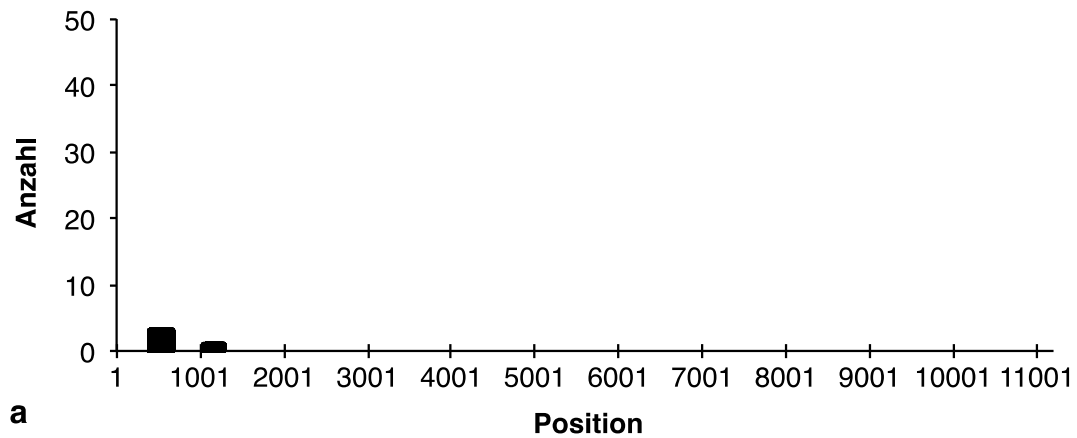


Abbildung 20: Anzahl und Position der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen aus den verschiedenen Bedingungen der Co-IP

Die Anzahl der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen aus den jeweiligen Bedingungen der Co-IP wurde an der jeweiligen Position ihrer Übereinstimmung aufgetragen.

- a) „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“
- b) „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“
- c) „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“

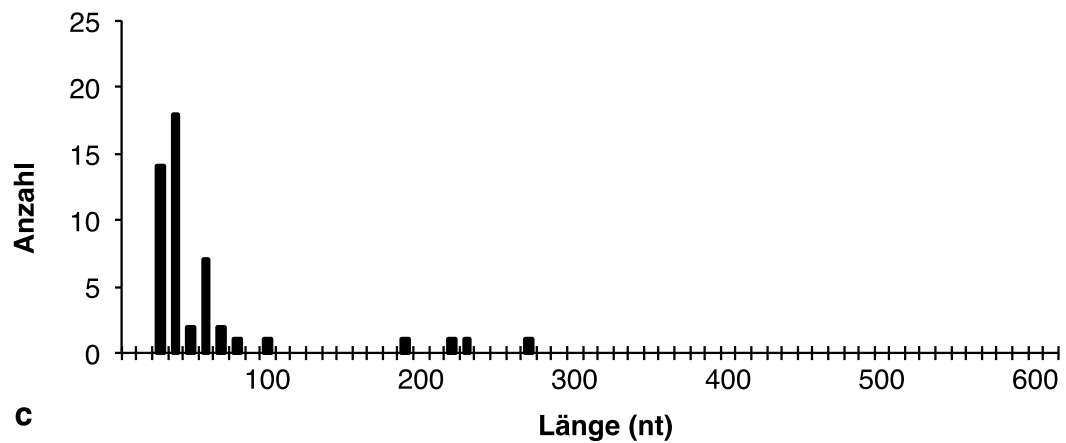
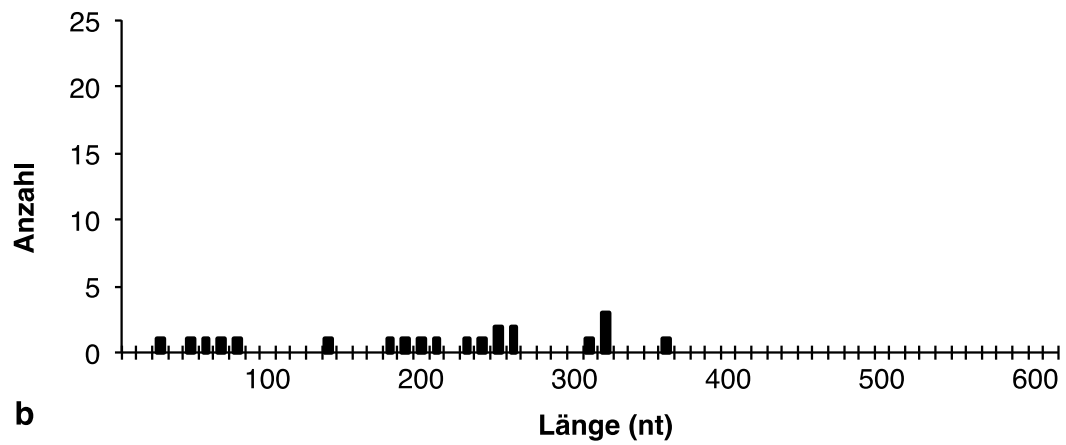
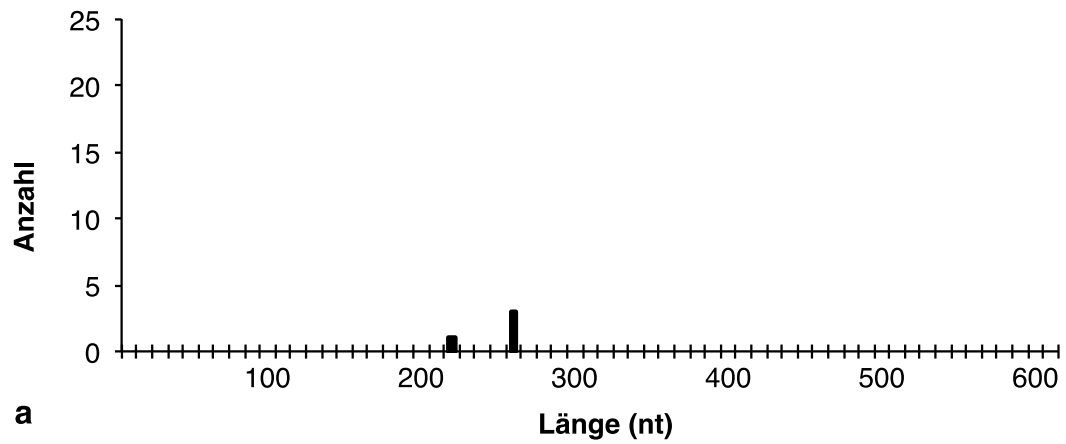


Abbildung 21: Anzahl und Länge der Sequenzen mit Übereinstimmung im VSV-Genom

a) „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“

b) „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“

c) „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“

Der genannte Anstieg der Übereinstimmung wird besonders ab Position 11.103 deutlich (siehe Abbildung 23). Dieser Bereich entspricht dem 3'-Ende der genomischen *Trailer*-RNA, die sich von Position 11.103 bis 11.161 erstreckt und somit am 5'-Ende des Genoms liegt. Zudem ist dieser Bereich der Sequenz identisch mit dem 5'-Ende der *Trailer*-Sequenz im Antigenom und dem 3'-Ende des *Trailer*-Transkripts des Antigenoms. Nach dem Anstieg am 3'-Ende der genomischen *Trailer*-Region folgt im *alignment* ein kurzes Plateau von etwa 30 Basen, dann fällt die Zahl der mit dem Genom übereinstimmenden Sequenzen Richtung 5'-Ende des Genoms wieder ab.

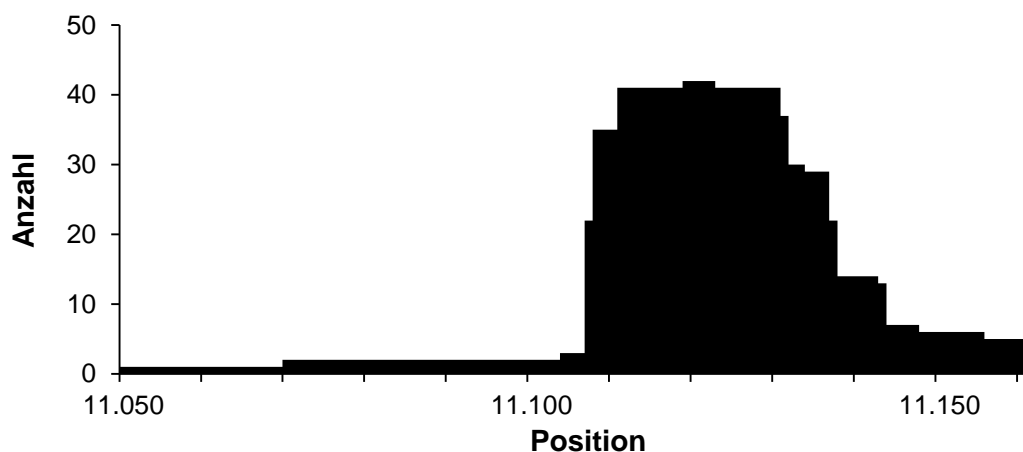


Abbildung 23: Anzahl und Position der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen aus der Co-IP-Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ am 5'-Ende des VSV-Genoms
 Die Anzahl der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen aus der Co-IP-Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ wurde an der jeweiligen Position der Übereinstimmung mit dem VSV-Genom ab Position 10.000 aufgetragen.

Die graphische Darstellung des *alignments* in Abbildung 20 c zeigte, dass die Übereinstimmung der Sequenzen mit den anderen Regionen des VSV-Genoms gering war. Quantifiziert man das *alignment* genspezifisch (siehe Tabelle 3), bestätigt sich, dass einzig die *Trailer*-Region an jeder Nukleotidposition mit mindestens 2 Sequenzen abgedeckt ist.

Tabelle 3: Verteilung der übereinstimmenden Sequenzen RIG-I/FLAG-assoziiierter RNA VSV-infizierter Zellen gegenüber dem VSV-Genom

| | leader | N | NS | M | G | L | trailer |
|----------|---------------|----------|-----------|-----------|-----------|-------------|----------------|
| Position | 1-47 | 51-1376 | 1386-2199 | 2209-3039 | 3049-4713 | 4723-11.095 | 11.103-11.161 |
| Ø | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 23,0 |
| Max | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 4,0 | 2,0 | 42,0 |
| Min | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 |

Beschriftung: Position der Gene im VSV-Genom, Mittelwert der Anzahl der übereinstimmenden Sequenzen (Ø), maximale (Max) und minimale (Min) Anzahl der übereinstimmenden Sequenzen.

Da die Anzahl der cDNAs in den Co-IP-Bedingungen unterschiedlich war, wurde das *alignment* auch auf die Anzahl der cDNA-Sequenzen mit Übereinstimmung normalisiert. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Sequenzen zwischen den Bedingungen einzig durch die Unterschiede in der Anzahl der sequenzierten *reads* erklärt werden kann (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen die Daten des *deep sequencing*, dass die *Trailer*-Sequenz Teil der RNA ist, die in VSV-infizierten Zellen an RIG-I bindet.

3.3.5 In der RIG-I/FLAG-koimmunpräzipitierten RNA findet sich der größte Anteil viraler gegenüber humaner RNA

Der Anteil der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen erklärte nur einen geringen Teil der nachgewiesenen Sequenzen. Daher wurde auch der Vergleich mit dem humanen Genom vorgenommen. Der Ursprung eines Großteils der Sequenzen konnte so für drei der vier untersuchten RNA-Proben erklärt werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich der Anzahl der übereinstimmenden Sequenzen zwischen dem humanen Genom (HG19) und dem VSV-Genom

| Bedingung | Anzahl der Sequenzen | Sequenzen mit Übereinstimmung im HG19 | Sequenzen mit Übereinstimmung im VSV-Genom |
|-------------|----------------------|---------------------------------------|--|
| Gesamt RNA | 26821 | 24378 | 33 |
| RIG-I+ VSV- | 25047 | 17243 | 4 |
| RIG-I- VSV+ | 64939 | 5052 | 22 |
| RIG-I+ VSV+ | 32987 | 26470 | 46 |

Die Übereinstimmung mit dem humanen Genom war für die Sequenzen der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen, der RIG-I/FLAG-assoziierten RNA aus nicht infizierten Zellen und der RIG-I/FLAG-assoziierten RNA VSV-infizierter Zellen relativ hoch (90,9, 68,8 bzw. 80,2 %). Der Anteil der Sequenzen der Bedingung „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ war mit 7,8% relativ niedrig.

Der Anteil der mit dem VSV-Genom übereinstimmenden Sequenzen, in Bezug auf alle Sequenzen der jeweiligen Bedingung, war in der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen und der Co-IP Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ am höchsten (1,2 bzw. 1,3 ‰). Für die Co-IP Bedingungen „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ und „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ war der Anteil deutlich geringer (0,01 und 0,03 ‰).

Zusammenfassend zeigt diese Analyse der Ergebnisse des *deep sequencing* der Co-IP-Bedingungen, dass sich mit der Methode virale Sequenzen anreichern lassen, aber dass unspezifisch gebundenen RNAs den größten Anteil sequenzierter RNAs ausmachen. Dies verdeutlicht die Problematik unspezifischer Bindungen bei Co-IPs.

4. Diskussion

4.1 Übersicht der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit etablierte ein Protokoll, dass den spezifischen Nachweis RIG-I-gebundener RNA aus Virus-infizierten Zellen ermöglicht. Im Falle von VSV konnte gezeigt werden, dass diese RNA die *Trailer*-Sequenz beinhaltet.

Experimente nachfolgender Promotionsprojekte von Andreas Linder und Viktoria Bothe (ebenfalls in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der LMU München) konnten die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse dahingehend bestätigen, dass die *Trailer*-Sequenz als Teil eines RIG-I-aktivierenden *Defective-Interfering* (DI)-Genoms identifiziert werden konnte.

Auch die *Deep-sequencing*-Experimente nach RIG-I-Co-IP anderer Gruppen weisen darauf hin, dass es sich bei VSV-assoziierten RNA-Liganden von RIG-I am ehesten um DI-Genome handelt. Diese DI-Genome tragen sowohl an ihrem 5'- als auch an ihrem 3'-Ende die *Trailer*-Sequenz. Das legt nahe, dass die *Trailer*-Region als Doppelstrang vorliegt, der direkt mit RIG-I interagiert.

Im folgenden Teil sollen die methodische Entstehung der Ergebnisse diskutiert werden und der Fund, dass die *Trailer*-Region Teil des RIG-I-Liganden ist mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen werden.

4.2 Diskussion der angewandten Methodik

4.2.1 Koimmunpräzipitation

Wie oben beschrieben, wurden die RIG-I/FLAG-exprimierenden Zellen für sechs, neun und zwölf Stunden mit VSV infiziert und dann lysiert. Mittels Phenol-Chloroform Extraktion wurde Gesamt-RNA gewonnen. Aus diesen Ergebnissen wurde der Zeitpunkt nach neun Stunden als der bestmögliche für die Analyse mittels RNA-Sequenzierung ausgewählt. Mit der Anfärbung von FLAG-markiertem RIG-I im Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass sich RIG-I/FLAG aufreinigen lässt. Mit RT-PCR und *deep sequencing* wurde belegt, dass die Anreicherung viraler RNA nach neun Stunden möglich ist.

Diese Vorgehensweise vernachlässigt jedoch die Tatsache, dass *in vivo* bereits etwa fünf Stunden nach Infektion (Gerlier *et* Lyles 2011) IFN im Blut nachgewiesen werden kann und die RIG-I Stimulation entsprechend früher stattfinden müsste.

Eine Erweiterung des kompletten Experimentes (Infektion, Co-IP, RNA-Isolation, cDNA-Umschrieb, Probenvorbereitung, *deep sequencing*) mit ansteigenden Zeiten der Infektion (zum Beispiel 1, 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden) wäre daher zwar aufwändig, aber vielversprechend. Dieser Ansatz würde die interessante Frage beleuchten, ob zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche RNAs als RIG-I-Liganden dienen.

4.2.2 Deep sequencing

Die 454 Sequenzierung bietet die Möglichkeit Sequenzen einer Länge von circa 300 bis 800 Basenpaaren zu sequenzieren. Längere Stränge, zum Beispiel genomische RNA bzw. cDNA, können nur in Fragmenten identifiziert werden. Durch Überlappungsanalysen kann die ursprüngliche Sequenz ermittelt werden. Im vorliegenden Experiment waren diese Überlappungen jedoch sehr selten (Daten nicht gezeigt).

Die Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen enthielt sehr viel RNA. Es wurde daraus aufgrund des gewählten Adapters präferentiell RNA mit *poly*(A)-Schwanz isoliert und sequenziert, während die nach Co-IP-isolierten RNAs ohne diese Selektion weiterverarbeitet wurden. Somit wurden zwar in der Gesamt-RNA VSV-mRNAs berücksichtigt, aber keine genomische VSV-RNA.

Zudem wurden die cDNAs der Gesamt-RNA bzw. der Co-IP-Bedingungen bei der Aufreinigung aus dem Agarose Gel in eine Länge von 500 bis 700 bzw. 200 bis 500 Basenpaaren fraktioniert. Ein direkter Vergleich zwischen der Gesamt-RNA und den reisolierten RNAs nach Co-IP mit Aussagen zur Anreicherung von RNAs ist daher wegen dieser unterschiedlichen Probenverarbeitung nicht möglich.

Die Häufigkeiten der cDNA-Sequenzen der drei Co-IP-Bedingungen (siehe Abbildung 18) fallen mit der Länge der Nukleotide ab (Maximum unter 100 Basenpaaren und Minimum über 500 Basenpaaren). Diese Längenverteilung lässt hier aber nicht den direkten Rückschluss zu, dass RIG-I bevorzugt kürzere RNAs bindet, obwohl dies bereits postuliert wurde (Kato *et al.* 2008, Baum *et al.* 2010). Die Verteilung der cDNAs kann durchaus Folge der methodischen Aufarbeitung der gebundenen RNAs sein. Kürzere cDNAs können RNA-Degradationsprodukten entsprechen.

Die Sequenzen, welche eine Übereinstimmung mit dem VSV-Genom haben, weisen in der Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und VSV-infiziert“ meist eine Länge um 50 Basen auf und zeigen eine maximale Anzahl der übereinstimmenden Sequenzen von 37. In der Gesamt-RNA sind die übereinstimmenden Sequenzen in überwiegender Anzahl 450 bis 500 Basen lang. Die Bedingung „RIG-I/FLAG-induziert und keine Infektion“ zeigt vier Sequenzen, die – vermutlich zufällig – an jeweils unterschiedlichen Stellen mit dem VSV-Genom übereinstimmen. Die Bedingung „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ zeigt maximal 22 Sequenzen, die an einer Stelle mit dem VSV-Genom übereinstimmen.

Beim Vergleich der Sequenzen mit dem humanen Genom (siehe Tabelle 4) fällt Folgendes auf: Die cDNA der Co-IP Bedingung „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ weist die geringste Übereinstimmung mit dem humanen Genom auf. In dieser Bedingung wurde somit verhältnismäßig viel virale RNA reisoliert. Dies kann daran liegen, dass in der Bindung an den Anti-FLAG-Antikörper die virale RNA ungeklärter Weise bevorzugt oder die humane RNA weniger wahrscheinlich an den Anti-FLAG-Antikörper bindet. Denkbar ist außerdem, dass die Infektion mit VSV ohne Überexpression von RIG-I/FLAG den Pool endogener RNA reduziert. Letztere Überlegung erscheint aber in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese für RNA und cDNA nach Co-IP (siehe Abbildungen 13 und 14) unwahrscheinlich. Die cDNA der mit dem Anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitierten RNA der Co-IP-Bedingung „VSV-infiziert und nicht RIG-I/FLAG-induziert“ zeigt relativ prominente Banden. Letztlich kann diese Beobachtung nicht eindeutig erklärt werden.

Eine weitere interessante Frage ist, wieso die Sequenzierung auch in der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen Sequenzen nachweisen konnte, die mit der *Trailer*-Sequenz übereinstimmen, obwohl bei der Probenverarbeitung primär *poly*(A) enthaltende Sequenzen selektiert wurden. Die *Trailer*- und *Leader*-RNA enthalten weder ein 5'-cap noch einen 3'-*poly*(A)-Schwanz.

Eine Hypothese beruht auf der Entstehung von *Read-through*-Produkten, die bei fehlerhafter Transkription der viralen Polymerase entstehen. Eine zweite Hypothese basiert auf der Tatsache, dass die *Trailer*-Sequenz in drei Abschnitten mindestens vier aufeinanderfolgenden Basen Adenin aufweist: Genomposition 11.129 bis 11.133, 11.135 bis 11.140 und 11.147 bis 11.150. Diese könnten sich im Umschrieb mit *oligo*(dT) Primern/Adapttern wie ein *poly*(A)-Schwanz verhalten.

Trotz der unterschiedlichen Probenvorbereitung kann man zusammenfassen, dass mit der hier beschriebenen Methode sowohl im Eluat nach RIG-I Co-IP, als auch in Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen die *Trailer*-Sequenz nachgewiesen wurde.

4.3 Beschriebene virale RIG-I-Liganden

Im Folgenden wird dargestellt, was über viralen Liganden der RLH bisher publiziert wurde.

RIG-I-abhängig werden insbesondere folgende Viren erkannt: Newcastle-Disease-Virus (Kato *et al.* 2005), Sendai-Virus (Yonemaya *et al.* 2005, Baum *et al.* 2010), Influenza-Virus (Kato *et al.* 2006), *Japanese-Encephalitis*-Virus (Kato *et al.* 2006) und Hepatitis-C-Virus (Saito *et al.* 2007).

MDA5 detektiert unter anderem das Encephalomyocarditis-Virus (Gitlin *et al.* 2006), das Theiler-Virus (Kato *et al.* 2006), das murine Norovirus-1 (McCartney *et al.* 2008) und das murine Hepatitis-Virus (Roth-Cross *et al.* 2008).

RIG-I und MDA5 erkennen jeweils eigenständig das Dengue-Virus und das *West-Nile*-Virus (Foy *et al.* 2005, Fredericksen *et al.* 2006, Loo *et al.* 2008).

Der Impfstamm des Masernvirus aktiviert sowohl RIG-I als auch MDA5, wohingegen der Wildtyp des Masernvirus kein IFN induziert (Shingai *et al.* 2007).

Das Reovirus, dessen Genom aus segmentierter dsRNA besteht, führt hauptsächlich über MDA5 zur IFN-Produktion und nur zu einem kleinen Anteil über RIG-I (Kato *et al.* 2008).

In einigen Fällen wurde beschrieben, dass RIG-I und MDA5 auch DNA-Viren erkennen. Das Epstein-Barr-Virus, ein DNA-Virus, produziert kleine RNA-Stränge, die RIG-I abhängig IFN induzieren (Samanta *et al.* 2006). Ein anderes DNA-Virus, das Herpes-simplex-Virus, kann während seines Replikationszyklus RIG-I- und MDA5-Liganden bilden (Rasmussen *et al.* 2009).

Eine Untersuchung zu RIG-I-Liganden, die während der Replikation des Hepatitis-C-Virus entstehen, brachte hervor, dass das 5'-Triphosphat-Ende des Genoms nicht alleine als PAMP ausreicht, um RIG-I zu aktivieren. Ein nicht-translatiertes Polyuridin-RNA-Motiv am 3'-Ende scheint nötig. Zusätzlich wurden die *Leader*-RNA des Tollwut-Virus, die 3'-Region des Ebola-Virus-Genoms und die *Leader*-Sequenz des Masernvirus als virale RIG-I-PAMPs beschrieben (Saito *et al.* 2008, Plumet *et al.* 2007).

Neben den bisher aufgeführten *In-vitro*-Untersuchungen, liegen nur für das Sendai-Virus und das Influenza-Virus Daten zu *In-vivo*-Liganden von RIG-I vor:

Zuerst wurde berichtet, dass einzelsträngige, virale Genome mit 5'-Triphosphat-Ende RIG-I-Liganden sind (Rehwinkel *et al.* 2010). In einer *Deep-sequencing*-Untersuchung nach RIG-I-Koimmunpräzipitation zeigte sich für das Sendai-Virus, dass RIG-I vor allem DI-Partikel erkennt. Diese entstehen, wenn die RNA-abhängige RNA-Polymerase der Viren fehlerhaft repliziert: Das Enzym überspringt bei einer hohen *multiplicity of infection* (MOI) einzelne Gene. Es entstehen virale Genome mit großen internen Deletionen. Diese verhalten sich während der Replikation kompetitiv gegenüber den Vollängen-Genomen, da sie schneller replizierbar sind. Zwingend notwendig für die Replikation dieser DI-Genome ist die gleichzeitige Infektion einer Zelle mit einem Virus kompletter Länge. Denn die Replikation von DI-Genomen benötigt die essentiellen viralen Proteine, wie das N-Protein (Gerlier *et al.* 2011).

Im Falle von Influenza bindet RIG-I nicht das gesamte Genom, sondern kurze genomische Abschnitte und subgenomische DI-Partikel (Baum *et al.* 2010). DI-Partikel des VSV mit RNA-Abschnitten aus *Sense*- und *Anti-sense*-Sequenz sind, im Gegensatz zu DI-Partikeln aus bloßer Negativstrang-RNA, effiziente IFN-Induktoren (Marcus *et al.* 1977).

Die IFN-Produktion während einer Infektion mit dem Masernvirus korreliert zeitlich mit der Transkription und nicht mit der Replikation: Während IFN-mRNA etwa zehn Stunden nach Infektion mit 1 MOI Masernvirus in ansteigender Konzentration nachweisbar ist, beginnt die Replikation des Genoms angeblich erst zehn Stunden später. Zu Beginn der Transkription und vor der Expression der mRNA wird die *Leader*-RNA umgeschrieben. Eine IVT-*leader*-RNA war in der Bindung an RIG-I im Gegensatz zu den übrigen umgeschriebenen RNA-Strängen deutlich überlegen. (Plumet *et al.* 2007)

Baum *et al.* verwendeten in ihrer Arbeit aus 2010 einen zum vorliegenden Projekt ähnlichen Ansatz (Baum *et al.* 2010). Nach Sendai-Virus Infektion von humanen Lungenkarzinomzellen mit konsekutiver Koimmunpräzipitation von RIG-I und RNA-Isolation, zeigten sie, dass die aufgereingte RNA abhängig vom 5'-Triphosphat immunstimulatorisch war. In der nachfolgenden Sequenzierung identifizierten Baum *et al.* ein *Copyback*-DI-Genom des Sendai-Virus in der Co-IP. Es bestand aus der *Trailer*-Sequenz am 5'-Ende, gefolgt von einer Teilsequenz des L-Gens und einer dritten Sequenz am 3'-Ende, welche genau komplementär zur *Trailer*-Sequenz ist (*Anti-trailer*). Das RNA-Molekül war 546 Nukleotide lang, trug eine 92 Nukleotide lange Doppelsträngigkeit und konnte zu zwei Zeitpunkten, 4 und 24 Stunden nach Infektion, nachgewiesen werden. Genomische RNA des Sendai-Virus wurde in dieser Arbeit nicht als RIG-I-Ligand identifiziert.

In einem zweiten Experiment führten Baum *et al.* den oben beschriebene Ansatz mit dem Influenza-Virus durch. Im Koimmunpräzipitat zeigten sich Anreicherungen von RNA verteilt über alle Genomsegmente. Auffallend waren dabei vier Bereiche: Zwei DI-RNA-Moleküle, sowie je ein kürzeres Segmente des NS- und des M-Gens waren in der Co-IP konzentriert. Baum *et al.* geben die genaue MOI, die sie für ihre Infektionen verwendeten, in ihrer Arbeit nicht an. Auch über die Herstellung der Viren erfährt man wenig. Ob die nachgewiesenen DI-Genome bereits im Virus-Stock vorhanden sind oder erst im Laufe der Infektion entstehen, wird nicht gezeigt.

Baum *et al.* nutzten für die Sequenzierung die Illumina Plattform mit mehreren Millionen Sequenzen pro Probe und RNA-Längen von circa 29 Nukleotiden. Im hier vorliegenden Experiment wurde die Roche 454 Sequenzierung genutzt. Da dabei deutlich weniger Sequenzen sequenziert wurden, erklären sich zum Teil auch die unterschiedlichen Maßstäbe bei den Ergebnissen: Baum *et al.* verwendeten bis zu 25×10^6 Sequenzen pro Probe. Die maximale Anzahl der übereinstimmenden Sequenzen pro Nukleotid lag bei bis zu 20.000 Sequenzen/Nukleotid im Bereich des DI-Partikels. Somit ergibt sich ein Anteil der übereinstimmenden an allen Sequenzen von etwa 1:1000.

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit wurden 25.047 bis 64.939 Sequenzen analysiert und die maximale Anzahl der übereinstimmenden Sequenzen lag bei 42. Das entsprechende Verhältnis liegt somit im Bereich zwischen 1:500 und 1:1600. Insgesamt ist das Ergebnis dieser Arbeit also hinsichtlich der Effektivität mit dem Ergebnis von Baum *et al.* vergleichbar.

Für das Sendai-Virus berichteten Rehwinkel *et al.* 2010, dass RIG-I-Liganden nur während der Replikation auftreten und aus einzelsträngigen Vollängen-Genomen mit 5'-Triphosphat-Ende bestehen (Rehwinkel *et al.* 2010). In der Arbeit wurde mit 5 MOI für 16 Stunden infiziert. Rehwinkel *et al.* berichteten über das Influenza Virus, dass die IFN-Stimulation vor allem von der Replikation abhängig ist, indem sie durch Mutationen der Polymerase entweder Transkription oder Replikation blockierten. Darüber hinaus sind laut der Autoren Genome voller Länge verantwortlich für die IFN-Induktion. Zudem sei das NS1-Protein mit dem RIG-I-Agonisten assoziiert. Die Induktion war zudem erwartungsgemäß vom 5'-Triphosphat-Ende abhängig. Allerdings nutzte die Arbeitsgruppe wiederhergestellte virale Ribonukleoproteine (RNPs): Plasmide, welche die genomische RNA, *Copy*-RNA und mRNA trugen, wurden für die Herstellung dieser RNPs in 293T Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurde aus diesen Zellen RNA isoliert und für die IFN-Stimulation verwendet.

Weber *et al.* zeigten 2013, dass RIG-I-Liganden im Falle einer Infektion mit dem La-Cross-Virus (LACV) aus Genomen bestehen (Weber *et al.* 2013). Diese sind in RNPs organisiert, die von RIG-I über eine *Panhandle*-Struktur der genomischen RNA erkannt werden. LACV gehört zur Familie der *Bunyviridae* und damit wie VSV zu den *Mononegavirales*. In der Arbeit von Weber *et al.* wurde allerdings keine Aussage zur Sequenz der Liganden getroffen.

TenOever *et al.* zeigten 2004, dass aus VSV isolierte RNPs die IRF3-Phosphorylierung induzieren (TenOever *et al.* 2004). Dabei war die beobachtete Kinetik der Immunantwort bei Transfektion der RNPs ähnlich der Kinetik bei Infektion mit dem Virus.

Insgesamt können die verschiedenen publizierten Modelle für *in-vivo*-RIG-I-Liganden nur begrenzt einheitlich interpretiert werden, da unterschiedliche Viren, Infektionsbedingungen und Methoden zur Charakterisierung der Liganden verwendet wurden. Weitere Arbeiten sind nötig, um die existierenden Befunde zu validieren und zu spezifizieren. Über einen möglichen Zusammenhang, zwischen der Tatsache, dass das Triphosphat-Ende in der *Trailer*-RNA am 5'-Ende des Genoms liegt und in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Anzahl der übereinstimmenden Sequenzen im 3'-Bereich der *Trailer*-RNA nachgewiesen wurde, lässt sich nur spekulieren. Beispielsweise wäre es vorstellbar, dass dort eine Doppelsträngigkeit mit 5'-Triphosphat im Rahmen einer kurzen, komplementären Sequenz eines *Copy-back*-DI-Genoms zur Erkennung durch RIG-I führt.

4.4 Die VSV-*trailer*-RNA als Teil des RIG-I-Liganden

Das beschriebene Ergebnis der Sequenzierung RIG-I-gebundener, viraler RNA lässt die Hypothese zu, dass VSV-*trailer*-RNA Teil eines RIG-I-Liganden ist. In diesem Abschnitt soll das bekannte Wissen über die *Trailer*-Sequenz zusammengefasst werden und anhand dessen die formulierte Hypothese diskutiert werden. Die VSV-*trailer*-Sequenz kommt in folgenden Nukleinsäuren vor:

- Genom (Negativstrang-Orientierung, *Trailer*-RNA am 5'-Ende)
- Antigenom (Positivstrang-Orientierung, *Trailer*-RNA am 3'-Ende)
- *Read-through*-mRNA der L-mRNA
- *Copy-back*-DI-Genome (Negativ- und Positivstrang-Orientierung, *Trailer*-RNA am 5'- und 3'-Ende)
- *Trailer*-RNA als isoliertes Transkript des Antigenoms

Weber *et al.* beschrieben 2013, dass RNPs des VSV als RIG-I-Liganden dienen (Weber *et al.* 2013). Zusammen mit den hier gezeigten Daten ergibt sich die Hypothese, dass RIG-I die RNA der RNPs über die genomische *Trailer*-Sequenz detektiert. Dass RIG-I virale RNA im RNP binden kann, wurde erst kürzlich postuliert (Yao *et al.* 2015).

Im vorliegenden Experiment konnte weder genomische noch antigenomische Vollängen-RNA detektiert werden. Mit einer Fehlerrate von wenigen Prozent missachtet die virale Polymerase bei der Transkription die Grenzen zwischen zwei Genen. Die entstehenden RNAs bezeichnet man als *Read-through*-RNA. Zwei Sequenzen des Experiments erstrecken sich in Ausrichtung der Co-IP-RNAs gegen das VSV-Genom bis in das L-Gen. Diese Sequenzen könnten auf das Vorliegen einer L-*Trailer-read-through* mRNA hindeuten. Auch die Möglichkeit, dass das Vollängen-Genom von RIG-I gebunden und während des Experiments partiell degradiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden.

DI-Partikel beinhalten ein verkürztes, virales Genom. Ihr Gehalt an Protein und Lipid entspricht in etwa dem normaler Viruspartikel. Sie sind nicht infektiös, da 50 bis 80% ihres Genoms deletiert sind (Bishop *et al.* 1985).

DI Partikel können nur replizieren, wenn sie eine Zelle gleichzeitig mit einem Virus infizieren, das ein Vollängen-Genom hat. Ihre genetische Information ist nicht ausreichend für eine selbständige Replikation. Eine Sonderform sind die *Copyback*-DI-Partikel. Diese entstehen, wenn die Polymerase während der Replikation vom Antigenom auf den entstehenden, neu synthetisierten RNA-Strang springt und einen zu diesem komplementären Strang synthetisiert. Das Ergebnis ist eine an ihren 3'- und 5'-Enden in sich komplementäre RNA mit einem *loop* (englisch für Schleife). Bemerkenswerterweise besteht bei allen bisher beschriebenen DI-Genome für VSV der komplementäre Abschnitt aus einem Teil der *Trailer*-RNA.

Diese RNAs wurden in Sendai-Virus-infizierten Zellen als RIG-I-Liganden beschrieben (Baum *et al.* 2010). DI-Genome sind ebenfalls in RNP verpackt. Für sie stellt sich also genauso, wie für das Genom und das Antigenom, die Frage, wie ihr 5'-Triphosphat-Ende durch RIG-I erkannt werden soll.

Die spontane Entstehung neuer DI-Genome ist jedoch ein relativ seltenes Ereignis. Experimentell sollte die Passage solcher DI-Partikel verhindert werden: Eine sehr geringe MOI des Inoculums gewährleistet dabei, dass keine Zelle von mehr als einem Viruspartikel infiziert wird und somit DI-Genome entstehen können. Dies wurde im vorliegenden Projekt beachtet. Dennoch kann eine Kontamination mit DI-Partikeln nicht sicher ausgeschlossen werden, da die ursprüngliche Virus-Lösung nicht auf DI-Partikel getestet wurde.

Nachfolgende Promotionsprojekte von Andreas Linder und Viktoria Bothe bekräftigten die Bedeutung der DI-Genome, indem sie zeigen konnten, dass die Menge immunstimulatorischer RNA mit der Anzahl der Viruspassagen und damit der Konzentration der DI-Partikel abnimmt.

Einige Autoren beschreiben, dass die VSV-*trailer*-RNA in Analogie zur *Leader*-RNA mit negativer Orientierung vom 3'-Ende des Antigenoms transkribiert wird. Sie ist neben dem Volllängen-Genom das einzige Transkript des Antigenoms. Die *Trailer-Sequenz* ist außerdem die einzige auf dem Antigenom befindliche Promoterregion für die virale Polymerase. Die von dieser Region transkribierte RNA trägt ein 5'-Triphosphat-Ende und ist nicht durch das RNP verpackt. (Gerlier *et al.* 2011)

Die Sekundärstruktur der *Trailer*-RNA erfüllt nicht alle Kriterien eines RIG-I-Liganden. Neben der Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende müsste eine ausreichend lange Doppelsträngigkeit vorliegen. Für den optimalen RIG-I-Liganden wurden von Schlee *et al.* folgende Kriterien postuliert (Schlee *et al.* 2009):

- Das Nukleosid, welches das Triphosphat trägt, weist eine Watson-Crick-Basenpaarung auf.
- Triphosphat-A-, Triphosphat-G- oder Triphosphat-U-Enden werden für dieses Nukleosid gegenüber Triphosphat-C bevorzugt.
- Überhänge am 5'-Triphosphat-Strang inhibieren die RIG-I-Aktivierung.
- Überhänge am nicht-Triphosphat- bzw. 3'-OH-Strang reduzieren die RIG-I-Aktivierung um über 70%.

Zusammenfassend zeigte die Gruppe um Martin Schlee, dass das dreifach phosphorylierte Nukleotid am 5'-Ende für die RIG-I-Aktivierung eine Doppelbindung aufweisen muss. Im Gegensatz wiesen Schmidt *et al.* (2009) nach, dass eine einzelne, überhängende Base am 5'-Ende hinsichtlich der RIG-I-Aktivierung tolerabel ist.

Obwohl die *Trailer*-RNA die bisher bekannten Kriterien eines RIG-I-Liganden nur partiell erfüllt (siehe Abbildung 23), erscheint sie auf Grund ihrer Anreicherung nach RIG-I-Koimmunpräzipitation aber als möglicher Teil des *in-vivo*-Liganden von RIG-I während der Infektion mit VSV.

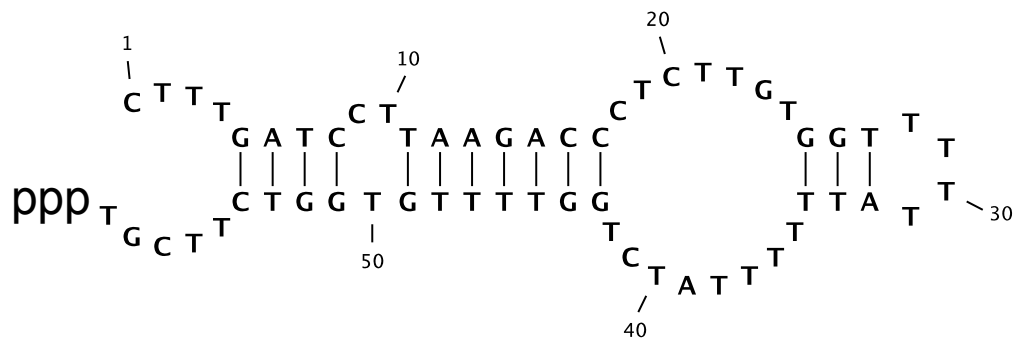


Abbildung 23: VSV-*trailer*-RNA Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur der *Trailer*-RNA wurde mit der Software *Genomics Workbench* der Fa. CLC modelliert. Die *Trailer*-RNA ist partiell zu sich selbst komplementär und bildet mehrere *loops*. Das 5'-Triphosphat-Ende geht keine Basenpaarung ein.

5. Ausblick

Wie können die Erkenntnisse der Grundlagenforschung zu RIG-I-Liganden klinisch genutzt werden? Ein möglicher Einsatz ist die Verwendung der Liganden als Adjuvanz. Dies sind natürliche oder synthetische Moleküle, die über eine Stimulation der angeborenen Immunität eine adaptive Immunantwort auslösen, zum Beispiel im Rahmen einer Impfung. Ein weiteres Beispiel, wie Adjuvantien eingesetzt werden können, ist der Effekt, die immunsuppressive Wirkung einer Krebszelle aufzuheben. Adjuvantien können dazu führen, dass Tumor-spezifische T-Zellen aktiviert und das immunsuppressive Milieu im Tumor durchbrochen wird (Zitvogel *et al.* 2009). Eines der ältesten zugelassenen Beispiele ist die Immuntherapie von nicht invasivem Blasenkrebs mittels lokaler Applikation von *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) Extrakten (Alexandroff *et al.* 2009).

Besch *et al.* veröffentlichten 2009 eine Studie, in der RIG-I- und MDA5-abhängig in Melanomzellen IFN- α und pro-apoptotische Signalwege induziert wurden. Die RLH-Liganden wurden liposomal umhüllt, um sie in das Zellinnere zu schleusen. Über einen p53-unabhängigen Signalweg, der über Noxa zu einer Freisetzung von Cytochrom C mit nachfolgender Apaf1- und Caspase 9- abhängigen Apoptose führt, konnten dabei Tumor-Zellen in den Zelltod getrieben werden. Dieser Effekt wird in gesunden, nicht-entarteten Zellen, von Bcl-xl inhibiert, sodass sich hier potentiell die Möglichkeit für ein therapeutisches Fenster ergibt.

Poeck *et al.* zeigten 2008, wie die zukünftige Anwendung synthetischer RIG-I-Stimuli aussehen könnte (Poeck *et al.* 2008): In einem Modell für das Maligne Melanom wurde mit einer gegen das Gen Bcl2 gerichteten *silencing* RNA (siRNA) gearbeitet. Bcl2 stabilisiert die Membran der Mitochondrien und wirkt so anti-apoptotisch. Die siRNA wurde am 5'-Ende dreifach phosphoryliert und stimuliert RIG-I-abhängig die IFN-Ausschüttung. Genabschaltung und Immunstimulation führten im Synergismus zu einem deutlicheren antitumoralen Effekt als jede der Strategien für sich genommen.

Das synthetische Retinoid CD 437 ist ein *small molecule* und potenzieller RIG-I Stimulus, der keine Liposomenhülle für den intrazellulären Transport benötigt. Er wird ebenfalls gegen das Maligne Melanom eingesetzt (Pan *et al.* 2009). In Glioblastom-Zellen konnte *in vitro* ein pro-apoptotischer Effekt nach RIG-I- und MDA5-Stimulation beobachtet werden. Nicht-maligne Zellen wurden dabei weitgehend verschont (Glas *et al.* 2013).

Es gibt auch negative Beispiele für Immunstimulation in malignen Zellen: Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation von TLR4 verstärkt die Tumorphiliferation in Karzinomen der Kopf und Halsregion (Szczepanski *et al.* 2009). Es sind somit in jedem Einzelfall fundierte Untersuchungen vonnöten und keine generellen Aussagen zum Nutzen einer Immunstimulation in der onkologischen Therapie möglich.

Jüngstes Beispiel für die klinische Relevanz der behandelten Thematik ist der Ausbruch der Ebola-Pandemie im westlichen Afrika. Eine entsprechende Studie stellte einen Impfstoff gegen das Ebola-Virus vor, der auf VSV basiert. Mäuse und Meerschweinchen wurden mit 2×10^4 bzw. 10^5 PFU des Impfstoffes immunisiert. Mäuse waren 6,5 und 9 Monaten danach vor einer letalen Dosis des Ebola-Virus geschützt. Nach 12 Monaten betrug der Schutz noch 80%. Meerschweinchen überlebten in 5 von 6 Fällen eine im Allgemeinen letale Ebola-Dosis 7 Monate nach Impfung. Bei Infektion nach 12 oder 18 Monaten überlebten alle Meerschweinchen. Im Serum der Tiere ließen sich IgG-Antikörper gegen das Ebola-Glykoprotein nachweisen (Wong *et al.* 2014). Ausgehend von diesem Befund bleibt abzuwarten, ob sich ähnliche Resultate auch in Primaten und auch Menschen reproduzieren lassen. Vielleicht ließe sich die Effektivität einer solchen Immunisierung durch eine zusätzliche RIG-I-Stimulation steigern.

Zusammenfassend könnte der RIG-I-Signalweg in Zukunft zu einem wichtigen Ansatzpunkt für Prophylaxe und Therapie von infektiösen, autoimmunologischen oder malignen Erkrankungen werden. Auf Basis der Grundlagenforschung könnte ein einfach strukturierter und spezifischer synthetischer Stimulus von RIG-I entstehen.

6. Zusammenfassung

Seit dem Jahr 2006 ist bekannt, dass RIG-I-Liganden ein 5'-Triphosphat-Ende tragen (Hornung *et al.* 2006 und Pichlmaier *et al.* 2006). Im Jahr 2009 wurde eine partielle Doppelstrang-Struktur als obligat für die Bindung des RIG-I-Liganden beschrieben. 2010 folgten die ersten Beobachtungen zu *In-vivo*-Liganden von RIG-I. Im Jahr 2014 wurde die Aktivierung von RIG-I durch Diphosphat-RNA gezeigt (Goubau *et al.* 2014).

Bis heute ist jedoch der RIG-I-Ligand im Falle einer Infektion mit VSV unbekannt. Die vorliegende Arbeit etablierte ein Protokoll mit dem RNA-Liganden von RIG-I im Zuge einer Infektion mit VSV isoliert werden können (Schmidt *et al.* 2014).

Dazu wurde die Co-IP von RIG-I-assoziiierter RNA über ein FLAG-*tag* in einer Zelllinie, die RIG-I/FLAG Tetrazyklin-induzierbar exprimiert, genutzt. Die koimmunpräzipitierte RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und per *deep sequencing* analysiert. Die Ergebnisse wurden mit der Sequenz des VSV-Genoms verglichen.

Dabei ließ sich eine Anreicherung in der 59 Basen langen *Trailer*-Sequenz im 5'-Ende des VSV-Genoms nachweisen. Die direkte Erkennung des Genoms erscheint aufgrund der Verteilung der Anreicherung unwahrscheinlich. Wie nachfolgende Untersuchungen bestätigen konnten, ist die *Trailer*-Sequenz ein Bestandteil von *Defective-interfering*-Genomen, die seit langer Zeit als potente IFN-Induktoren bekannt sind und als potentielle Liganden für RIG-I gelten.

7. Literaturverzeichnis

- Ablasser A**, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature Immunology*. 2009; 10(10):1065–72.
- Albertini AAV**, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RWH. Structural aspects of Rabies virus replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65(2):282–94.
- Alexandroff AB**, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *The Lancet*. 1999; 353(9165):1689–94.
- Alexopoulou L**, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001; 413(6857):732–8.
- Baum A**, Sachidanandam R, García-Sastre A. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010; 107(37):16303–8.
- Blander JM**, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*. 2006; 440(7085):808–12.
- Bishop DHL**. The genetic basis for describing viruses as species. *Intervirology*. 1985; 24(2):79–93.
- Collins SE**, Noyce RS, Mossman KL. Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *Journal of Virology*. 2004; 78(4):1706–17.
- Cui S**, Eisenächer K, Kirchhofer A, Brzózka K, Lammens A, Lammens K, Fujita T, Conzelmann KK, Krug A, Hopfner KP. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular Cell*. 2008; 29(2):169–79.
- Foy E**, Li K, Sumpter R, Loo Y-M, Johnson CL, Wang C, u. a. Control of antiviral defenses through Hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2005; 102(8):2986–91.
- Fredericksen BL**, Gale M. West nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. *Journal of Virology*. 2006; 80(6):2913–23.

- Gerlier D**, Lyles DS. Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: towards a rational model. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011; 75(3):468–90.
- Gitlin L**, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, u. a. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic: polyribocytidylic acid and Encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2006; 103(22):8459–64.
- Girardin SE**, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jéhanho M, Viala J, u. a. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003; 300(5625):1584–7.
- Glas M**, Coch C, Trageser D, Daßler J, Simon M, Koch P, u. a. Targeting the cytosolic Innate Immune receptors RIG-I and MDA5 effectively counteracts cancer cell heterogeneity in glioblastoma. *Stem Cells*. 2013; 31(6):1064–74.
- Goubau D**, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, u. a. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature*. 2014; 514(7522):372–5.
- Graham FL**, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from Human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. 1977; 36(1):59–72.
- Hornung V**, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, u. a. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006; 314(5801):994–7.
- Hornung V**, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, u. a. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009; 458(7237):514–8.
- Isaacs A**, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 1957; 147(927):258–67.
- Yao H**, Dittmann M, Peisley A, Hoffmann H-H, Gilmore RH, Schmidt T, u. a. ATP-dependent effector-like functions of RIG-I-like Receptors. *Molecular Cell*. 2015; 58(3):541–8.
- Yoneyama M**, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, u. a. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 2004; 5(7):730–7.
- Yoneyama M**, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews*. 2009; 227(1):54–65.

- Kawasaki T**, Kawai T, Akira S. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2011; 243(1):61–73.
- Kato H**, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, u. a. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. 2005; 23(1):19–28.
- Kato H**, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, u. a. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006; 441(7089):101–5.
- Kato H**, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, u. a. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008; 205(7):1601–10.
- Kim D-H**, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nature Biotechnology*. 2004; 22(3):321–5.
- Kowalinski E**, Lunardi T, McCarthy AA, Loubser J, Brunel J, Grigorov B, u. a. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell*. 2011; 147(2):423–35.
- Liu L**, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, u. a. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International*. 2012; 2012: 251364.
- Loo Y-M**, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, u. a. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *Journal of Virology*. 2008; 82(1):335–45.
- McCartney SA**, Thackray LB, Gitlin L, Gilfillan S, Virgin HW, Colonna M. MDA-5 recognition of a murine Norovirus. *PLOS Pathog*. 2008; 4(7):e1000108–e1000108.
- Malathi K**, Dong B, Gale M, Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*. 2007; 448(7155):816–9.
- Marcus PI**, Sekellick MJ. Defective interfering particles with covalently linked [±] RNA induce interferon. *Nature*. 1977 ;266(5605):815-9.
- Meister G**, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, u. a. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Current Biology*. 2005; 15(23):2149–55.

- Olitsky PK, Cox HR, Syverton JT.** Comparative studies on the viruses of vesicular stomatitis and equine encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*. 1934; 59(2):159–71.
- Pan M, Geng S, Xiao S, Ren J, Liu Y, Li X, u. a.** Apoptosis induced by synthetic retinoic acid CD437 on human melanoma A375 cells involves RIG-I pathway. *Archives of Dermatological Research*. 2009; 301(1):15–20.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, u. a.** RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006; 314(5801):997–1001.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan C-P, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, u. a.** Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *Journal of Virology*. 2009; 83(20):10761–9.
- Plumet S, Herschke F, Bourhis J-M, Valentin H, Longhi S, Gerlier D.** Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of Measles virus as activator of the RIG-I-mediated interferon response. *PLoS One*. 2007; 2(3):e279–e279.
- Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, u.a.** 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nature Medicine*. 2008 Nov;14(11):1256–63.
- Rasmussen SB, Jensen SB, Nielsen C, Quartin E, Kato H, Chen ZJ, u. a.** Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *Journal of General Virology*. 2009; 90(1):74–8.
- Rehwinkel J, Tan CP, Goubau D, Schulz O, Pichlmair A, Bier K, u. a.** RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell*. 2010; 140(3):397–408.
- Roth-Cross JK, Bender SJ, Weiss SR.** Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia. *Journal of Virology*. 2008; 82(20):9829–38.
- Saito T, Hirai R, Loo Y-M, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, u. a.** Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007; 104(2):582–7.
- Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale Jr. M.** Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*. 2008; 454(7203):523–7.

- Satoh T**, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, u. a. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010; 107(4):1512–7.
- Samanta M**, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *The EMBO Journal*. 2006; 25(18):4207–14.
- Schlee M**, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, u. a. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*. 2009; 31(1):25–34.
- Schmidt A**, Linder A, Linder N, Rothenfusser S. Isolation of RIG-I-associated RNAs from virus-infected cells. In: Anders HJ, Migliorini, A (Herausgeber): *Innate DNA and RNA Recognition*. Springer; 2014. S. 37–44.
- Schmidt A**, Schwerdt T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, u. a. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2009; 106(29):12067–72.
- Shingai M**, Ebihara T, Begum NA, Kato A, Honma T, Matsumoto K, u. a. Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of Measles virus. *The Journal of Immunology*. 2007; 179(9):6123–33.
- Sun YW**. RIG-I, a human homolog gene of RNA helicase, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell. Shanghai Second Medical University, Shanghai. 1997 (Promotionsarbeit)
- Sun L**, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013; 339(6121):786–91.
- Szczepanski MJ**, Czystowska M, Szajnik M, Harasymczuk M, Boyiadzis M, Kruk-Zagajewska A, u. a. Triggering of Toll-like Receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Research*. 2009; 69(7):3105–13.
- tenOever BR**, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, Julkunen I, u. a. Activation of TBK1 and IKK kinases by Vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *Journal of Virology*. 2004; 78(19):10636–49.
- Thomas D**, Newcomb WW, Brown JC, Wall JS, Hainfeld JF, Trus BL, u. a. Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis. *Journal of Virology*. 1985; 54(2):598–607.

- Tytell** AA, Lampson GP, Field AK, Hilleman MR. Inducers of interferon and host resistance. 3. Double-stranded RNA from Reovirus type 3 virions (reo 3-RNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1967; 58(4):1719.
- Weber** M, Gawanbacht A, Habjan M, Rang A, Borner C, Schmidt AM, u. a. Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host and Microbe*. 2013; 13(3):336–46.
- Wong** G, Audet J, Fernando L, Fausther-Bovendo H, Alimonti JB, Kobinger GP, u. a. Immunization with Vesicular stomatitis virus vaccine expressing the Ebola glycoprotein provides sustained long-term protection in rodents. *Vaccine*. 2014; 32(43):5722–9.
- Wu** J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, u. a. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*. 2013; 339(6121):826–30.
- Yoneyama** M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, u. a. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*. 2004; 5(7):730–7.
- Zhang** X, Wang C, Schook LB, Hawken RJ, Rutherford MS. An RNA helicase, RHIV -1, induced by Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is mapped on porcine chromosome 10q13. *Microbial Pathogenesis*. 2000; 28(5):267–78.
- Zitvogel** L, Kroemer G. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119(8):2127.

8. Abkürzungen und Akronyme

| | |
|-------|--|
| AIM2 | <i>Absent in melanoma 2</i> |
| AP1 | <i>Activator protein 1</i> |
| ASC | <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCG | <i>Bacille Calmette Guerin</i> |
| BHK | <i>Baby hamster kidney</i> |
| bp | Basenpaare |
| CARD | <i>Caspase-recruitment-domain</i> |
| cDNA | <i>Copy-DNA</i> |
| cGAS | <i>Cyclic GMP-AMP synthase</i> |
| Co-IP | <i>Co-immunoprecipitation</i> (deutsch Koimmunpräzipitation) |
| CTD | C-terminale Domäne |
| DC | <i>Dendritic cell</i> |
| DI | <i>Defective-interfering</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure |
| EMCV | Enzephalomyokarditis-Virus |
| Fa. | Firma |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| HEK | <i>Human embryonic kidney cells</i> |
| IFN | Interferon Typ I |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunpräzipitation |
| IPS1 | <i>Interferon-β promoter stimulator</i> |
| IRF | <i>Interferon regulatory actor</i> |
| ISRE | <i>Interferon-stimulated response elements</i> |
| IVT | <i>In-vitro</i> -Transkription |

| | |
|-------------------|---|
| LACV | La-Cross-Virus |
| LGP2 | <i>Laboratories of genetics and physiology 2</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAVS | <i>Mitochondrial anti viral signalling</i> |
| MDA5 | <i>Melanoma-differentiation antigen 5</i> |
| MOI | <i>Multiplicity of infection</i> |
| mRNA | <i>Messenger-RNA</i> |
| NBD | Nukleotid-bindende Domäne |
| NFκB | <i>Nuklear-factor-κ-B</i> |
| NLR | <i>Nod-like-Rezeptor</i> |
| OH | Hydroxylgruppe |
| PAMP | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PCR | Polymerase- <i>chain</i> -Reaktion |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| <i>poly</i> (A) | <i>poly</i> (Adenosin) |
| <i>poly</i> (I:C) | <i>poly</i> (Inosin:Cytidin) |
| PRR | <i>Pattern-recognition-Rezeptoren</i> |
| RD | Regulatorische Domäne |
| RIG-I | <i>Retinoic-acid inducible gene I</i> |
| RLH | <i>RIG-I-like-Helikasen</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RNP | Ribonucleoprotein-Partikel |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptions-Polymerase- <i>chain</i> -Reaktion |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| siRNA | <i>Small-interfering-RNA</i> oder <i>Silencing-RNA</i> F |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TBST | <i>Tris-buffered saline and tween</i> |
| TLR | <i>Toll-like-Rezeptor</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| VSV | Vesicular-stomatitis-Virus |
| YFP | <i>Yellow-fluorescent protein</i> |

9. Danksagung

Mein Dank geht an meinen Betreuer Dr. rer. nat. Andreas Schmidt und meinen Doktorvater Professor Dr. med. Simon Rothenfuß. Mit Enthusiasmus, Geduld und Expertise haben sie mich theoretisch und praktisch in das wissenschaftliche Arbeiten eingewiesen.

Herrn Professor Dr. med. Stefan Endres, dem Leiter der Abteilung für Klinische Pharmakologie an der LMU München, danke ich für sein Engagement in der Ausbildung junger Wissenschaftler. Er definiert den Rahmen für die erfolgreiche Arbeit in der „Klinpharm“ und ist ein idealer Mentor.

Das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München bot durch die Seminare und die finanzielle Förderung eine weitere, wesentliche Unterstützung.

Meine Familie hat mich während Studium und Dissertation in vielerlei Hinsicht unterstützt. Dafür möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken. Im Besonderen danke ich abschließend meinem Bruder Andreas für seine Korrekturen dieses Manuskriptes und die wissenschaftliche Fortsetzung und Vertiefung des Projektes.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Die *Trailer*-Sequenz der viralen RNA ist Teil des RIG-I-Liganden bei Infektion mit Vesicular-Stomatitis-Virus“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand